

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

CARACTÉRISATION MOLÉCULAIRE ET FONCTIONNELLE DE LA
PROTÉINE REV DU VIRUS DE L'IMMUNODÉFICIENCE BOVINE

THÈSE
PRÉSENTÉE
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DU DOCTORAT EN BIOLOGIE

PAR
ANDREA LILIAM GOMEZ CORREDOR

OCTOBRE 2011

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de cette thèse se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.01-2006). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

REMERCIEMENTS

Je désire tout d'abord remercier mon directeur de recherche, le Dr Denis Archambault, de m'avoir accueillie dans son laboratoire. Je le remercie également pour m'avoir laissée la latitude nécessaire à un étudiant de doctorat, principalement pour la confiance qu'il m'a manifestée pour gérer une grande partie de la thèse.

Je désire remercier également les membres de mon jury de thèse, les Drs Benoît Barbeau, Daniel Martineau et Elsy Édouard pour le temps qu'ils ont consacré à lire et évaluer cette thèse.

Je tiens également à remercier les filles du laboratoire, Mesdemoiselles Elodie Roques et Aurélie Girard pour tous les bons moments que j'ai passés avec elles, pour m'avoir soutenue moralement dans les moments un peu plus difficiles. Votre présence a ainsi rendu mon travail plus facile et plus agréable, surtout les thérapies de groupe des vendredis après-midi. Sans ces rencontres, cela aurait été difficile.

Merci à Madame Marie-Claude St-Louis pour ses conseils judicieux pendant une grande partie de mon doctorat.

Je tiens également à remercier Sabrina Peiro qui, en plus de m'avoir donné son amitié inconditionnelle, a fracassé tous les records pour corriger la plupart des documents que j'ai rédigés dans un temps record. Je ne sais pas ce que j'aurais fait sans elle.

Je désire remercier également Denis Flipo pour m'avoir guidée tout au long de mes expériences avec la microscopie confocale et de fluorescence et aussi pour son amitié.

J'ai eu également la chance d'avoir des midis en compagnie principalement de Monique Boily et Gabrielle Vernouillet, les filles du labo et aussi Denis Flipo. Merci d'avoir écouté mes joies et aussi mes tristesses tout au long de mon doctorat.

Je désire remercier Philippe Cournoyer pour son amitié et son soutien moral. Tu as rafraîchi l'ambiance du laboratoire et tes encouragements sont arrivés dans le bon temps dans la dernière ligne droite de cette thèse.

Merci à tous mes collègues de l'Université du Québec à Montréal pour leur support moral, leurs encouragements, ainsi que pour les nombreux dépannages techniques.

Je remercie aussi très fort mes parents, pour leur amour, pour leur présence spirituelle, même s'ils sont en Colombie, dans les bons comme dans les mauvais moments, pour leurs conseils, pour leur soutien. Sans votre éducation et vos valeurs, rien n'aurait été possible. J'aimerais remercier Miguel Angel Perez avec qui je partage non seulement ma vie mais, maintenant aussi mon petit Rafael. Merci pour ton amour, pour tout ton soutien dans les moments difficiles, pour ta patience, pour ton aide et tout simplement pour être là.

En fin, je remercie la Fondation UQAM, la Bourse FARE et le CRSNG programme Découvertes qui, grâce à leur support financier, ont permis l'achèvement de ces travaux de doctorat.

TABLE DES MATIERES

| | |
|---|--------------|
| LISTE DES FIGURES | x |
| LISTE DES TABLEAUX..... | xii |
| LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES..... | xiii |
| RÉSUMÉ..... | xviii |
| INTRODUCTION..... | 1 |
| CHAPITRE I | |
| REVUE DE LA LITTÉRATURE | 4 |
| 1.1 Caractéristiques générales des retrovirus | 4 |
| 1.2 Le virus de l'immunodeficiency bovine (VIB)..... | 6 |
| 1.2.1 Distribution et pathologie du VIB | 7 |
| 1.2.2 Tropisme du VIB | 9 |
| 1.2.3 Mode de transmission du VIB | 10 |
| 1.2.4 Morphologie et organisation du génome du VIB | 11 |
| 1.2.5 Cycle viral..... | 20 |
| 1.3 La protéine Rev du VIH-1..... | 26 |
| 1.3.1 L'élément de réponse à Rev ou RRE..... | 28 |
| 1.3.2 Domaines structuraux et fonctionnels de Rev | 31 |
| 1.3.3 Cycle de transport nucléaire de Rev | 32 |
| 1.3.4 Les nouvelles fonctions de Rev | 35 |

| | |
|--|----|
| 1.3.5 Protéines Rev différentes de celle du VIH et les protéines « <i>Rev-Like</i> » | 38 |
| 1.4 Le transport nucléo-cytoplasmique | 39 |
| 1.4.1 Le complexe du nucléopore ou NPC | 40 |
| 1.4.2 La famille des karyophérines β | 42 |
| 1.4.3 L'importation au noyau | 47 |
| 1.4.4 L'exportation du noyau des protéines et des ARN au cytoplasme | 52 |

CHAPITRE II

| | |
|--|-----------|
| THE BOVINE IMMUNODEFICIENCY VIRUS REV PROTEIN: IDENTIFICATION OF A NOVEL LENTIVIRAL BIPARTITE NUCLEAR LOCALIZATION SIGNAL HARBORING AN ATYPICAL SPACER SEQUENCE | 53 |
| 2.1 Abstract | 54 |
| 2.2 Introduction | 55 |
| 2.3 Materials and Methods | 58 |
| 2.3.1 Cell cultures and transfections | 58 |
| 2.3.2 Construction of Rev deletion mutants | 58 |
| 2.3.3 Rev fusion proteins | 59 |
| 2.3.4 Red fluorescence fusion proteins | 60 |
| 2.3.5 Indirect immunofluorescence assay | 61 |
| 2.3.6 Fluorescence and confocal microscopy | 61 |
| 2.3.7 Chloramphenicol acetyltransferase (CAT) assay | 62 |
| 2.3.8 SDS-PAGE and Western blot analyses | 63 |

| | |
|---|----|
| 2.4 Results | 64 |
| 2.4.1 BIV Rev fused to EGFP predominantly localizes to the nucleoli | 64 |
| 2.4.2 Intracellular localization of BIV Rev deletion mutants | 66 |
| 2.4.3 Two regions are essential for the nuclear localization of BIV Rev | 69 |
| 2.4.4 The NLS motif in BIV Rev is bipartite | 71 |
| 2.4.5 The NoLS of BIV Rev | 74 |
| 2.4.6 Functional analysis of BIV Rev NLS and NoLS mutants | 75 |
| 2.5 Discussion | 77 |
| 2.6 Acknowledgements | 83 |

CHAPITRE III

| | |
|---|-----------|
| THE BOVINE IMMUNODEFICIENCY VIRUS REV PROTEIN: IDENTIFICATION OF NOVEL NUCLEAR IMPORT PATHWAY AND NUCLEAR EXPORT SIGNAL AMONG RETROVIRAL REV/REV-LIKE PROTEINS | 84 |
| 3.1 Abstract | 85 |
| 3.2 Introduction | 86 |
| 3.3 Materials and methods | 89 |
| 3.3.1 Cell cultures and transfections | 89 |
| 3.3.2 Plasmids and plasmid constructs | 90 |
| 3.3.3 Site-directed mutagenesis | 91 |
| 3.3.4 Purification and labeling of recombinant proteins | 92 |
| 3.3.5 <i>In vitro</i> nuclear import assay | 93 |
| 3.3.6 Leptomycin B treatment | 94 |
| 3.3.7 Fluorescence microscopy | 94 |
| 3.3.8 Indirect immunofluorescence assay | 95 |

| | |
|---|-----|
| 3.3.9 Chloramphenicol acetyltransferase (CAT) assay | 95 |
| 3.3.10 SDS–PAGE and Western blot analyses..... | 96 |
| 3.3.11 GST pull-down assay | 97 |
| 3.4 Results..... | 97 |
| 3.4.1 Nuclear import of BIV Rev is dependent on cytosolic factors and the nucleopore..... | 97 |
| 3.4.2 ATP and Ran protein are required for the nuclear importation of BIV Rev | 99 |
| 3.4.3 BIV Rev nuclear import does not rely on direct binding importin β pathway..... | 101 |
| 3.4.4 Importins α and β are both required for nuclear import of BIV Rev and importin $\alpha 3$ and $\alpha 5$ isoforms are transport receptors..... | 103 |
| 3.4.5 CRM1-specific inhibitor LMB increases BIV Rev nuclear accumulation.. .. | 106 |
| 3.4.6 The NES of BIV Rev | 107 |
| 3.4.7 The NES motif is critical for the nuclear export activity of BIV Rev | 110 |
| 3.5 Discussion | 112 |
| 3.6 Acknowledgements..... | 118 |

CHAPITRE IV

| | |
|--|-----|
| LOCALIZATION OF THE MULTIMERIZATION AND RNA BINDING DOMAINS OF THE BOVINE IMMUNODEFICIENCY VIRUS REV PROTEIN | 119 |
| 4.1 Abstract | 120 |
| 4.2 Introduction..... | 121 |

| | |
|---|-----|
| 4.3 Materials and methods | 123 |
| 4.3.1 Cell cultures and transfections..... | 123 |
| 4.3.2 Plasmids..... | 124 |
| 4.3.3 Purification of recombinant proteins | 124 |
| 4.3.4 <i>In vitro</i> multimerisation assay | 125 |
| 4.3.5 <i>In vivo</i> multimerisation assay | 125 |
| 4.3.6 Indirect immunofluorescence assay..... | 125 |
| 4.3.7 Fluorescence microscopy..... | 126 |
| 4.3.8 Chloramphenicol acetyltransferase (CAT) assay | 126 |
| 4.3.9 SDS–PAGE and Western blot analyses..... | 127 |
| 4.4 Results..... | 128 |
| 4.4.1 Purification and production of BIV Rev WT and mutant proteins..... | 128 |
| 4.4.2 BIV Rev WT protein forms multimers <i>in vitro</i> | 130 |
| 4.4.3 BIV Rev WT protein forms multimers <i>in vivo</i> | 131 |
| 4.4.5 Two regions in BIV Rev are involved in protein multimerization..... | 133 |
| 4.4.6 Mapping the RNA binding domain (RBD) of BIV Rev..... | 133 |
| 4.5 Discussion | 137 |

CHAPITRE V

DISCUSSION GÉNÉRALE..... 142

| | |
|--|-----|
| 5.1 La protéine Rev du VIB est atypique en comparaison avec les autres protéines Rev ou Rev-like des rétrovirus..... | 142 |
| 5.1.1 Les NLS et NoLS..... | 143 |
| 5.1.2 Le RBD | 145 |

| | |
|---|------------|
| 5.1.3 Le NES..... | 149 |
| 5.1.4 Le domaine de multimérisation | 150 |
| 5.2 La Protéine Rev et le nucléole | 151 |
| 5.3 Le VIB comme un modèle d'étude des lentivirus non pathogènes..... | 157 |
| 5.4 Un NLS monopartite versus un NLS bipartite : une différence pendant le processus d'infection des lentivirus ? | 159 |
| CONCLUSION..... | 163 |
| APPENDICE A: PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES | 166 |
| APPENDICE B: COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES | 189 |
| RÉFÉRENCES..... | 198 |

LISTE DES FIGURES

| | |
|---|----|
| 1.1 Morphologie du VIB. | 13 |
| 1.2 Cycle de réplication des lentivirus. | 22 |
| 1.3 Rétrotranscription des lentivirus. | 23 |
| 1.4 Phases initiale et tardive de l'expression des ARNm du VIH-1. | 28 |
| 1.5 Structure du RRE et domaines structuraux de Rev du VIH-1. | 30 |
| 1.6 Cycle de transport de Rev. | 34 |
| 1.7 Séquences des différents domaines riches en arginines et leucines des protéines Rev ou “ <i>Rev-like</i> » chez les lentivirus et les rétrovirus | 38 |
| 1.8 Structure du NPC. | 41 |
| 1.9 Transport nucléo-cytoplasme et le cycle de Ran..... | 44 |
| 1.10 Structure de l'importine α et interaction avec l'importine β | 49 |
| 1.11 Voie classique d'importation au noyau..... | 50 |
| 2.1 Nuclear and nucleolar localization of BIV Rev WT protein in fusion with EGFP (EGFP-Rev). | 65 |
| 2.2 Analysis of BIV Rev protein deletion mutants reveals the importance of aa 71 to 110 for the intracellular localization of Rev. | 68 |
| 2.3 The region encompassing aa 71 to 100 of BIV Rev protein is associated with NLS and NoLS functions. | 70 |
| 2.4 The NLS of the BIV Rev protein is of a bipartite type. | 73 |
| 2.5 Identification of amino acid residues necessary for the nucleolar localization of BIV Rev protein.. | 75 |
| 2.6 Functional analysis of BIV Rev NLS and NoLS mutants..... | 76 |
| 3.1 Nuclear import of BIV Rev in HeLa cells is an active transport dependent of cytosolic factors and the nucleopore..... | 98 |

| | |
|--|-----|
| 3.2 Nuclear import of BIV Rev in HeLa cells is dependent of energy and Ran protein. | 100 |
| 3.3 The BIV Rev protein is not imported into the nucleus by importin β alone..... | 102 |
| 3.4 The BIV Rev protein is transported into the nucleus by the classical nuclear import pathway involving importins $\alpha 3$ and $\alpha 5$ | 106 |
| 3.5 The BIV Rev protein nuclear export is CRM1-dependent..... | 107 |
| 3.6 The region encompassing amino acids (aa) 111 and 130 of BIV Rev is associated to nuclear export function of the protein..... | 109 |
| 3.7 Identification of amino acid (aa) necessary for the nuclear exportation of BIV Rev. | 111 |
| 3.8 PKI and HIV-1 Rev classes of NES consensus sequences. | 117 |
| 4.1 Expression and purification of BIV Rev mutant proteins..... | 129 |
| 4.2 <i>In vitro</i> multimerization of BIV Rev WT protein. | 131 |
| 4.3 <i>In vivo</i> multimerisation of BIV Rev protein.. | 132 |
| 4.4 Oligomeric formation of BIV Rev mutants. | 134 |
| 4.5 Mapping of the RBD of BIV Rev. | 136 |
| 5.1 Domaines fonctionnels des protéines Rev et « Rev-like » des virus de la famille <i>Retroviridae</i> | 145 |
| 5.2 Domaines fonctionnels de la protéine Rev du VIB..... | 163 |
| 5.3 Cycle de transport de la protéine Rev du VIB. | 164 |

LISTE DES TABLEAUX

| | |
|--|-----|
| 1.1 Famille de karyophérines β ou transporteurs nucléaires | 42 |
| 2.1 Listing of the BIV Rev mutant proteins ^a | 60 |
| 2.2 NLSs and NoLSs ^a | 79 |
| 3.1 NES sequences of Rev/” <i>Rev-like</i> » proteins | 118 |
| 4.1 Listing of BIV Rev RBD mutant proteins ^a | 135 |

LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES

| | |
|----------|--|
| aa | amino-acids |
| AC | anneau cytoplasmique |
| ADN | acide désoxyribonucléique |
| AN | anneau nucléaire |
| ARM | « arginine rich motif » |
| ARM* | répétitions en tandem de type Armadillo |
| ARN | acide ribonucléique |
| ARNm | ARN messenger |
| ARNt | ARN de transfert |
| CA | capside |
| CAEV | « caprine arthritis encephalitis virus » |
| CAS | « cellular apoptosis susceptibility » |
| CAT | chloramphenicol acetyltransferase |
| CBP80 | « CAP-binding protein 80 » |
| Cf2Th | cellules fœtales de thymus canin |
| CMV | cytomegalovirus |
| CRM1 | « chromosome region maintenance 1 protein » |
| CTE | « constitutive transport element » |
| DAPI | 4',6-diamidino-2-phenylindole |
| DFC | « dense fibrillar center » |
| DLS | « dimer linkage structure » |
| DMS | « dimethyl Sulfate Footprinting » |
| dUTPases | « deoxyuridine 5'-triphosphate pyrophosphatase » |
| EBV | « epstein-Barr virus » |

| | |
|---------------|--|
| ECL | « enhanced chemiluminescence » |
| EGFP | « enhanced green fluorescent protein » |
| EIAV | virus de l'anémie infectieuse équine |
| eIF5A | « eukaryotic initiation factor 5A » |
| EMSA | « electrophoretic mobility shift assay » |
| ENE | enveloppe nucléaire externe |
| ENI | enveloppe nucléaire interne |
| EREp | cellules d'épithélium embryonnaire du lapin |
| FG | phénylalanine-glycine |
| FITC | fluorescein isothiocyanate |
| FN | filaments nucléaires |
| FRAP | « fluorescence recovery after photobleaching » |
| FRET | « fluorescence resonance energy transfer » |
| GA | glutaraldehyde |
| Gag | « group antigen-associated gene » |
| GAPDH | glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase |
| GC | « granular component » |
| GDP | guanosine-5'-diphosphate |
| GST | glutathione S-transferase |
| HCDA | « human cytidine deaminase » |
| HEAT | « <u>h</u> untingtin, <u>e</u> longation factor 3, PR65/ <u>A</u> subunit of protein phosphatase 2A and the <u>t</u> OR lipid kinase » |
| HERV-K | « human endogenous retrovirus K » |
| HIC | « human I-mfa domain containing protein » |
| HIF- α | « hypoxia-inducible factor α » |
| HLa | « human La protein » |
| HLHZ | « helix-loop-helix-leucine-zipper » |
| HnRNP1 | « heterogeneous nuclear ribonucleoprotein » |
| HPiV-3 | « human parainfluenza virus type 3 » |

| | |
|--------------|---|
| hRAC3 | « human receptor coactivator 3 » |
| HSV-1 | « herpes simplex virus 1 » |
| HTLV | virus de la leucémie des cellules T |
| IBB | « importin β binding » |
| IL-6 | interleukine 6 |
| IN | Intégrase |
| JDV | « jembrana disease virus » |
| Kaps β | karyophérines- β |
| KSHV | « kaposi's sarcoma associated herpesvirus » |
| LMB | « leptomycin B » |
| LTR | « long terminal repeat » |
| MA | matrice |
| MDM2 | « murine double minute 2 protein » |
| MMTV | « mouse mammary tumor virus » |
| MMV | « maedi-visna virus » |
| M-PMV | « pfizer monkey virus » |
| MuLV | « moloney murine leukemia virus » |
| NC | nucléocapside |
| NES | « nuclear exportation signal » |
| NFT2 | « nuclear transport factor 2 » |
| NIS | « nuclear diffusion inhibitory signa »l |
| NLS | « nuclear localization signals » |
| NLSc | NLS classiques |
| NLSnc | NLS non classiques |
| NoLS | « nucleolar localization signals » |
| NPC | nucléopore |
| nt | nucleotides |
| Nups | nucléoporines |
| ORF | « open reading frames » |

| | |
|--------------|--|
| PABP1 | « poly(A)-binding protein 1 » |
| PC | « pore central » |
| PKI | « protein kinase inhibitor » |
| PPT | « polypurine tract » |
| PR | protéase |
| PTHrP | « parathyroid hormone related protein » |
| RBD | « RNA binding domain » |
| Rev | « regulator of virus expression » |
| RFP | « red fluorescent protein » |
| RHA | « RNA helicase A » |
| RRE | élément de réponse à Rev |
| RRL | « rabbit reticulocyte lysate » |
| RSV | « rous sarcoma virus » |
| RT | « reverse transcriptase » |
| Sam68 | « 68 kDa Src-associated substrate during mitosis » |
| SDS | « sodium dodecyl sulfate » |
| ShRNA | « small harpin RNA » |
| SIDA | syndrome de l'immunodéficience acquise |
| SREBP-2 | « sterol regulatory element-binding protein2 » |
| Sw15 | « saccharomyces cerevisiae transcription factor » |
| TAR | élément de réponse à Tat |
| Tat | « trans-activator factor of transcription » |
| TM | transmembranaire |
| TNF α | facteur de nécrose tumorale alpha |
| TRAIL | « tumor necrosis factor-related apoptosis-induced ligand » |
| TREX | « transcription/export » |
| VEGF | facteur de croissance endothélial vasculaire |
| VIB | virus de l'immunodéficience bovine |
| Vif | « viral infectivity factor » |

| | |
|-----|--------------------------------------|
| VIF | virus de l'immunodéficience féline |
| VIH | virus de l'immunodéficience humaine |
| VIS | virus de l'immunodéficience simienne |
| VLB | virus de la leucémie bovine |
| WGA | « wheat germ agglutinin » |
| WT | « wild type » |

RÉSUMÉ

Les lentivirus sont un groupe de virus appartenant à la famille des *Retroviridae*. Le modèle par excellence pour l'étude des lentivirus est le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) qui est l'agent causant le syndrome d'immunodéficience acquise ou SIDA. Les études réalisées sur les protéines du virus telles que Nef, Vpu, Tat et Rev ont permis de mieux connaître la biologie et les mécanismes de pathogenèse du VIH de type 1 (VIH-1). Le virus de l'immunodéficience bovine (VIB) est un lentivirus qui a servi de modèle d'étude de la protéine Tat du VIH. Bien que le VIH-1 et le VIB appartiennent aux lentivirus, les maladies qu'ils causent sont très différentes. Le potentiel pathogénique du VIB est controversé et les mécanismes pathogéniques et la biologie du VIB ne sont pas encore bien connus. Seule la protéine Tat a été bien caractérisée. L'étude approfondie des autres protéines virales nécessaires à la réplication du virus comme la protéine Rev permettront de donner des outils nécessaires à la compréhension de la biologie du VIB et des mécanismes impliqués dans la pathogenèse des lentivirus.

La protéine Rev a une fonction essentielle dans la réplication des lentivirus. Le rôle de Rev est d'exporter les ARNs viraux non épissés et partiellement épissés du noyau au cytoplasme pour produire en outre les protéines nécessaires à l'assemblage des nouvelles particules virales. La protéine Rev du VIH-1 contient minimalement quatre domaines fonctionnels importants: un domaine basique riche en arginines nécessaire à la liaison de l'ARN ou RBD qui contient des signaux de localisation nucléaire et nucléolaire (NLS et NoLS), un domaine riche en leucines nécessaire à l'exportation du complexe Rev-ARN (NES) et deux régions nécessaires à la multimérisation de Rev. Le but de ce projet est de caractériser moléculairement et biologiquement la protéine Rev du VIB.

Dans ces travaux, nous rapportons la caractérisation des NLS et NoLS de la protéine Rev du VIB. Grâce à la transfection d'une série de protéines mutantes de Rev du VIB fusionnées à la *enhanced green fluorescent protein* (EGFP). Nous avons démontré que le NLS de la protéine Rev du VIB est bipartite. Ce type de NLS est le premier à être identifié dans la famille des protéines Rev des lentivirus/rétrovirus. De plus, nous avons déterminé que le NoLS était localisé entre les deux motifs basiques du NLS bipartite de Rev du VIB. Le NoLS de Rev du VIB est aussi unique et diffère de la séquence consensus rapportée pour d'autres protéines virales et/ou cellulaires, toute nature confondue.

Pour l'importation au noyau, nous avons démontré que la protéine Rev du VIB est importée par la voie classique (importines α : β) et que les importines $\alpha 3$ et $\alpha 5$ sont

impliquées, fait qui contraste avec l'importation au noyau de la protéine Rev du VIH-1. Nous avons aussi caractérisé le domaine d'exportation ou NES de Rev du VIB en déterminant que le mécanisme d'exportation était CRM1-dépendant de façon similaire que la protéine Rev du VIH-1. Nous avons aussi identifié les résidus qui composent le NES de la protéine Rev du VIB qui appartient au groupe de PKI NES et non à celui de Rev VIH-1 NES, ce qui constitue une première chez les lentivirus.

Pour compléter la caractérisation des domaines fonctionnels de la protéine Rev du VIB, les domaines de multimérisation et de liaison à l'ARN furent identifiés. Nous avons observé que Rev du VIB était capable de multimériser *in vitro* et *in vivo* dans le cytoplasme et deux régions impliquées dans cette fonction ont été identifiées. En plus, nous avons cartographié un domaine RBD bipartite chez Rev du VIB. Nous avons montré que le premier motif du RBD était situé dans la région centrale de la protéine et chevauchait le NoLS et le NLS bipartite alors que le deuxième motif était situé à l'extrémité C-terminale de la protéine Rev du VIB.

En conclusion, les principaux domaines fonctionnels de la protéine Rev du VIB ont été caractérisés. Les résultats obtenus ont clairement démontré que la protéine Rev du VIB est unique chez les lentivirus et les rétrovirus. Les caractéristiques de la protéine Rev du VIB pourraient aider à expliquer en partie les profondes différences de pathogénicité observées chez les lentivirus.

Mots-clés: VIB, Rev, NLS, NES, VIH

INTRODUCTION

Les lentivirus sont un groupe de virus appartenant à la famille des *Retroviridae*. Ils causent une grande variété de maladies dont certaines sont associées à une suppression du système immunitaire. Les lentivirus ont une grande variété d'hôtes chez les mammifères et le développement de maladies, la gravité et les mécanismes de pathogenèse varient selon le type de lentivirus et des hôtes qu'ils infectent. Les infections causées par les lentivirus peuvent être regroupées en trois catégories : 1) des infections caractérisées par la mort ou la récupération de l'animal sans récurrence de la maladie comme dans le cas de celle associée au « *Jembrana disease virus* » (JDV, un lentivirus bovin); 2) des infections comme celle associée au virus de l'anémie infectieuse équine (EIAV) qui produisent une phase clinique aigue suivie d'une période d'apparente récupération et ensuite de rechutes cliniques; et 3) des infections qui présentent de longues périodes d'incubation asymptomatiques, suivi d'une maladie à progression fatale comme dans le cas du virus de l'immunodéficience féline (VIF), de certains virus de l'immunodéficience simienne (VIS) et les virus de l'immunodéficience humaine (VIH) de type 1 et 2. Le VIH-1 est l'agent causal du syndrome d'immunodéficience acquise ou SIDA, une infection qui est à l'état pandémique. On estime à 33,3 millions le nombre de personnes vivant avec le VIH et à environ 2,8 millions des nouvelles infections dans le monde seulement pendant l'année 2009. Les lentivirus les plus étudiés sont les lentivirus humains. La biologie moléculaire, les mécanismes des certaines protéines associées à la pathogenèse du VIH-1, le rôle des différentes protéines structurales comme Gag et Pol et les protéines nécessaires à la réplication du virus comme Tat, Rev, Nef et Vpu sont maintenant bien élucidés.

La protéine Rev du VIH-1 était connue jusqu'à récemment comme une protéine accessoire lors du cycle réplcatif du VIH-1. Sa fonction était limitée au transport des

ARN viraux non épissés et partiellement épissés du noyau au cytoplasme pendant la phase tardive de l'infection. Les nouvelles études sur la protéine Rev du VIH-1 ont montré qu'elle ne doit plus être considérée comme une protéine accessoire seulement, mais plutôt comme une protéine majeure impliquée dans le processus infectieux du virus. En effet, Rev est capable d'inhiber l'intégration de l'ADN proviral, d'empêcher la réinfection de la cellule et d'augmenter les niveaux de transcription et d'encapsidation des nouvelles particules virales.

Le virus d'immunodéficience bovine (VIB) est un lentivirus bovin qui a été utilisé comme modèle d'étude de la protéine Tat (nécessaire à la transcription des gènes viraux) du VIH. Le potentiel pathogénique du VIB est controversé si bien que les premières études ont associé le VIB à une immunosuppression chez les animaux infectés alors que d'autres études n'ont pas établi une relation directe avec une maladie déterminée. Aussi, différentes études ont suggéré une prédisposition à des maladies opportunistes chez les animaux séropositifs pour le VIB. Par contre, peu est connu sur la biogenèse du VIB.

Bien que la protéine Tat du VIB ait été bien caractérisée dû à son homologie avec la protéine Tat du VIH-1, les rôles des autres protéines nécessaires à la réplication comme la protéine Rev de même que ceux des autres protéines non structurales ne sont pas encore établis. La caractérisation moléculaire et biologique de la protéine Rev est importante pour déterminer si le mécanisme d'action de Rev du VIB est similaire à celui établi pour les protéines Rev des autres lentivirus. Les études approfondies de la protéine Rev du VIB permettront d'aider à mieux comprendre les mécanismes fondamentaux de la biologie du VIB. Elles pourront possiblement résulter en une meilleure compréhension des différences qui existent entre deux virus qui appartient au même groupe de lentivirus en égard de leur capacité ou non de produire une maladie, soit un virus très pathogénique comme le VIH-1 et un virus non ou peu pathogénique comme le VIB.

Cette thèse comprend une revue de la littérature (Chapitre I), les résultats obtenus pour la caractérisation des principaux domaines fonctionnels de la protéine Rev du VIB qui sont présentés sous la forme de trois articles scientifiques (Chapitres II, III et IV), une discussion générale (Chapitre V) et une conclusion.

CHAPITRE I

REVUE DE LA LITTÉRATURE

1.1 CARACTERISTIQUES GÉNÉRALES DES RETROVIRUS

Les rétrovirus sont des virus qui infectent les animaux. Ils causent une grande variété de maladies principalement associées à une suppression du système immunitaire et à la transformation des cellules de l'hôte. La principale caractéristique de cette famille est la présence d'une transcriptase inverse (RT pour « reverse transcriptase »), enzyme qui transforme leur génome ARN en ADN double brin. Ce dernier est intégré de façon stable dans le génome de la cellule hôte, ce qui permet une transmission persistante du génome aux générations suivantes de cellules. Une autre caractéristique spécifique des rétrovirus est que l'ARN viral est pris en charge complètement par la machinerie des ARN messager (ARNm) de la cellule hôte. La réplication du génome est initiée par un ARN de transfert (ARNt) et les rétrovirus sont les seuls qui ont une chaîne d'ARN simple brin à polarité positive et qui n'ont pas un comportement d'ARNm pendant la réplication (Coffin JM, 1997).

La famille *Retroviridae* a été récemment divisée en sept genres : *Alpharetrovirus*, *Betaretrovirus*, *Gammaretrovirus*, *Deltaretrovirus*, *Epsilonretrovirus*, *Spumavirus* et *Lentivirus* (Pringle, 1999). Les virus des genres *Alpharetrovirus*, *Betaretrovirus* et *Gammaretrovirus* sont considérés comme des rétrovirus simples, leur génome codant seulement pour les protéines structurales et enzymatiques comme Gag, Pol, Pro, et Env. Les virus des genres *Deltaretrovirus*, *Epsilonretrovirus*, *Spumavirus* et *Lentivirus* sont plus complexes. Leur génome code pour les protéines structurales et aussi pour différentes protéines régulatrices et/ou accessoires. La classification est basée sur les similarités des séquences des acides aminés de la protéine RT. Comme

les virus des cinq premiers genres sont la cause de tumeurs et sont liés aux cancers de nombreux animaux, ils sont nommés rétrovirus oncogéniques (Goff, 2007). Les spumavirus ou « foamy viruses », quant à eux, produisent la vacuolisation et la formation de syncytia dans les cellules en culture et infectent différents animaux incluant les primates (Calattini et al., 2006).

Les *Lentivirus* sont un genre de virus qui ont une grande diversité d'hôtes chez les mammifères comme les bovins, les chats, les chevaux, les chèvres, les moutons et les primates (Desrosiers, 2007). Le genre inclut en autres deux lentivirus bovins, le virus de la maladie de Jembrana ou « Jembrana disease virus » JDV et le virus de l'immunodéficience bovine (VIB), et deux lentivirus de petits ruminants, soit ovin (« maedi-visna virus », MMV) et caprin (« *Caprine arthritis encephalitis virus* », CAEV). Le genre comprend aussi un virus équin (« Equine infectious anemia virus », EIAV), le virus de l'immunodéficience des félins (VIF) et les virus de l'immunodéficience des primates dont font partie ceux du groupe des virus de l'immunodéficience simienne (VIS). Enfin, il y a aussi deux virus d'immunodéficience humaine (VIH-1 et VIH-2). La découverte du VIH-1 comme agent causal du syndrome de l'immunodéficience acquise (SIDA) a permis une recherche intense sur les lentivirus et un intérêt grandissant sur les études biologiques et génétiques comparatives de tous les membres du genre des *Lentivirus* (Desrosiers, 2007).

Plusieurs éléments génétiques des différents types de lentivirus sont conservés même si le taux de mutation pendant la réplication est de l'ordre de $10^6 - 10^7$ dans le génome viral intégré dans les cellules hôtes (Chakrabarti et al., 1987; Ji et Loeb, 1994). Une des régions les plus conservées est le site de liaison du ARNtLys (ARNt^{Lys}) qui est une séquence de quinze nucléotides fortement conservée chez tous les lentivirus. Les autres éléments qui sont conservés sont la séquence riche en purines (appelée PPT pour « polypurine tract ») qui sert comme amorce pour la

synthèse du brin plus d'ADNc, l'élément de réponse à Rev (RRE : « Rev Responsive Element ») et l'élément Psi (Foley, 2000).

1.2 LE VIRUS DE L'IMMUNODÉFICIENCE BOVINE (VIB)

En 1969, le Dr Cameron Seger a observé la détérioration progressive de la condition physique d'une vache gravide de 8 ans nommée R-29 qui présentait des signes cliniques de leucocytoses, une lymphadénopathie, des désordres neurologiques avec des lésions au niveau du système nerveux central et un amaigrissement progressif (Malmquist, Van der Maaten et Boothe, 1969). Le virus isolé à partir de R-29 avait une morphologie similaire à celle des autres lentivirus et était capable de développer des signes pathologiques au niveau du système immunitaire chez les animaux infectés expérimentalement (Van der Maaten, Malmquist et Cheville, 1972). Le virus n'a pas été étudié jusqu'à la découverte du VIH en 1983 (Barre-Sinoussi et al., 1983). C'est suite à cela que le virus a été nommé officiellement virus de l'immunodéficience bovine ou VIB (Gonda et al., 1987). À la fin des années 1980, deux clones infectieux proviraux ont été obtenus : le VIB R-29 106 et le VIB R-29 127. Ceux-ci ont servi aux études détaillées du virus en laboratoire (Gonda et al., 1987; Garvey et al., 1990). Par la suite, deux nouvelles souches de VIB, FL112 et FL491, ont été isolées pendant une étude faite en Floride aux États-unis (Suarez et al., 1993).

Cependant, un autre lentivirus bovin, le JDV, présente un faible niveau d'homologie (74%) avec la souche R-29 du VIB (Chadwick et al., 1995a). En plus, le JDV cause une maladie atypique qui affecte seulement le bétail de l'île de Bali. Cette maladie est caractérisée par de la fièvre, de la léthargie, de l'anorexie et une lymphoadénopathie. Une grande partie des animaux infectés meurent 1 à 2 semaines après l'infection (Chadwick et al., 1995b; Wilcox, Chadwick et Kertayadnya, 1995; Wareing et al., 1999).

1.2.1 Distribution et pathologie du VIB

Les études de séroprévalence pour les infections par le VIB ont indiqué que le virus est distribué mondialement. Le virus a été détecté en Europe, Asie, Inde, Australie, Nouvelle-Zélande et en Amérique du Nord et du Sud (Gonzalez et al., 2008; Corredor, St-Louis et Archambault, 2010) .

Les lentivirus à l'exception du JDV induisent une infection persistante de longue durée avec une forte réponse immunitaire. Les manifestations cliniques se produisent après une période d'incubation de plusieurs années. La maladie, une fois présente, affecte plusieurs organes et est caractérisée par un affaiblissement progressif et par une diminution de la réponse immunitaire envers des pathogènes opportunistes, pouvant conduire à la mort dans le cas du VIH (Walder et al., 1995; Meas et al., 2002; Desrosiers, 2007; Goff, 2007).

La pathologie clinique de l'infection du VIB reste controversée. Il n'existe pas de relation directe entre la présence du VIB et un syndrome clinique très spécifique. Il se peut toutefois que la présence du virus rende les animaux plus susceptibles à des infections bactériennes ou virales. Différentes études ont démontré une liaison entre le virus et un état de maladie. Le bovin R-29 duquel le virus a été isolé initialement avait présenté des symptômes de lymphocytose, des lésions au niveau de système nerveux central et un amaigrissement progressif (Van der Maaten, Malmquist et Cheville, 1972). Des changements hématologiques et une lymphadénopathie avec hyperplasie folliculaire, des lésions au niveau de la peau, des méningo-encéphalites et la non réponse à des thérapies ont aussi été répertoriés chez le bétail naturellement et expérimentalement infecté avec le VIB (Braun et al., 1988; Martin et al., 1991; Carpenter et al., 1992; Onuma et al., 1992; Flaming et al., 1993; Rovid, Carpenter et Roth, 1995). Chez ces animaux, le virus est transcriptionnellement actif et peut être isolé à partir des cellules mononucléaires du sang périphérique plusieurs années après

l'infection (Brownlie, Collins et Heaton, 1994; Baron et al., 1995). La présence d'infections bactériennes opportunistes et d'encéphalites a aussi été rapportée chez des animaux avec un titre élevé d'anticorps contre le VIB (Snider et al., 1996). Finalement, une étude a proposé une relation entre le VIB et le développement du syndrome paraplégique bovin (Walder et al., 1995), mais jusqu'à maintenant cette hypothèse reste sans confirmation.

La relation directe du VIB avec une maladie spécifique chez les animaux a aussi été rendue controversée par la co-infection avec le virus de la leucémie bovine (VLB) qui appartient au genre des *Deltaretrovirus*. Un taux de co-infection VIB-VLB d'environ 4-9% a été rapporté chez différentes populations de bovins (Gonzalez et al., 2007; Brujeni et al., 2010). Les facteurs environnementaux, la race de vaches ou les souches de virus VIB peuvent influencer la susceptibilité à l'infection par le VLB (Flaming et al., 1993; Flaming et al., 1997). Le VLB produit une leucémie létale chez les vaches caractérisée par une augmentation du nombre des lymphocytes B au niveau du sang périphérique. La prévalence du VLB est élevée dans diverses régions du monde, incluant les Etats-Unis où les pertes économiques dues au bétail infecté par le VLB ont été estimées à \$ 525 millions en 2003 (Gillet et al., 2007).

À l'heure actuelle, l'importance du VIB pour la santé animale reste difficile à établir vu la vie brève du bétail, l'absence de maladie clinique chez les animaux infectés et le nombre peu élevé d'isolats disponibles. Néanmoins, l'infection au VIB pourrait entraîner un impact économique puisqu'il semble associé à une perte de poids, une diminution de la production de lait et des maladies opportunistes chez le bétail (McNab, Jacobs et Smith, 1994).

Bien que le lapin puisse être infecté par le VIB, les études chez cette espèce sont controversées. Des études ont démontré que les lapins infectés expérimentalement développent une forte réponse immunitaire à l'infection par le VIB avec des

lymphadénopathies bénignes sans toutefois montrer des signes apparents de maladie (Pifat et al., 1992; Van Der Maaten et Whetstone, 1992; Fischer et al., 1994; Abed et al., 1999; Abed et Archambault, 2000). Une autre étude a démontré le développement d'une maladie caractérisée par une dysfonction du système immunitaire qui conduit à la mort des animaux par un mécanisme similaire à celui des lentivirus comme les VIH 1 et 2 chez l'homme, le VIS et le VIF (Kalvatchev et al., 1995).

1.2.2 Tropisme du VIB

Comme pour les autres lentivirus, le VIB présente un tropisme spécifique pour les cellules de lignée lymphoïde, les monocytes/macrophages (Carpenter et al., 1992; Onuma et al., 1992; Pifat et al., 1992) et plus particulièrement pour les lignées de cellules B (Whetstone et al., 1997). *In vivo*, les bovins (*Bos taurus*) et les ovins sont infectés naturellement. Des anticorps contre le VIB ont été détectés chez les moutons et les chèvres mais dans les premières études, ni le virus ni la présence de l'ADN proviral n'ont été mis en évidence (Whetstone, VanDerMaaten et Miller, 1991; Smith et Jacobs, 1993; Jacobs et al., 1994). Récemment, une étude a démontré la présence d'ADN proviral chez des chèvres infectées expérimentalement avec le VIB (Lymans'ka et al., 2007). Les lapins expérimentalement infectés avec le VIB présentent des altérations de la réponse immunitaire (Onuma et al., 1990; Pifat et al., 1992; Van Der Maaten et Whetstone, 1992; Archambault et al., 1993; Hirai et al., 1994). L'ADN viral a été isolé à partir de cellules mononucléaires périphériques, de cellules de la rate, des ganglions lymphatiques, des poumons, du sperme et du cerveau d'animaux malades (Gonda et al., 1990; Pifat et al., 1992; Nash, Hanson et St Cyr Coats, 1995b; Nash, Hanson et St Cyr Coats, 1995a; Zhang et al., 1997a; Baron et al., 1998).

Des souris transgéniques contenant dans leur génome le provirus du VIB montrent une méningo-encéphalite associée à un taux de mortalité de 50% (Gonda et

al., 1994). Ce neurotropisme a aussi été observé chez des souris infectées par le VIH 1 et 2 (Leonard et al., 1988). Par contre, les souris, les rats et les cobayes ne sont pas susceptibles à l'infection naturelle par le VIB (Gonda, 1992). Une étude récente a démontré que le VIB peut infecter le bétail de l'île de Bali (*Bos javanicus*). L'infection montre un pic maximal de réplication juste après l'infection par le VIB, mais le virus comme chez *Bos taurus* ne produit pas de maladie visible chez *Bos javanicus* (McNab et al., 2010).

In vitro, le VIB est capable d'infecter une variété de cellules adhérentes et en suspension qui proviennent de différents tissus et de différentes espèces animales. Dans des cellules similaires aux fibroblastes, le VIB induit la formation de syncytia (cellules multinucléées suite à la fusion de plusieurs cellules). Des infections produisant des virions infectieux ont été générées à partir de cultures primaires bovines de cellules embryonnaires, de cellules de rate, de cerveau, de poumons, de thymus, de reins et de testicules (Gonda et al., 1987). De plus, différentes lignées cellulaires stables ont été infectées avec le VIB, comme les cellules fœtales de thymus canin (Cf2Th), les cellules d'épithélium embryonnaire du lapin (EREp) et plusieurs lignées d'origine bovine (Gonda et al., 1990). Cependant, seules les cellules Cf2Th sont capables de maintenir une infection de longue durée (Bouillant, Ruckerbauer et Nielsen, 1989; Gonda et al., 1990). Finalement, le VIB est incapable d'infecter des cellules humaines en culture (Kashanchi et al., 1991; Whetstone et al., 1992).

1.2.3 Mode de transmission du VIB

Le mode de transmission naturelle du VIB n'a pas été établi jusqu'à maintenant, mais il serait similaire aux autres lentivirus, c'est-à-dire par l'échange de fluides biologiques. Le virus a été retrouvé dans le colostrum (Meas et al., 2002), le sperme (Nash, Hanson et St Cyr Coats, 1995a), (Gradil et al., 1999), le lait et le sang (Nash,

Hanson et St Cyr Coats, 1995b). Le VIB peut être transmis expérimentalement par l'inoculation intraveineuse de matériel infecté comme du sang ou des cellules (Belloc et al., 1996; Snider et al., 1997). Des études récentes ont mis en évidence la transmission verticale du VIB chez les vaches (Moody et al., 2002) ainsi que de la co-infection avec le VLB (Meas et al., 2002). Par contre, les facteurs tels la transmission materno-fœtale, la charge virale maternelle pendant la gestation ou les mois de gestation les plus susceptibles à l'infection n'ont pas encore été déterminés.

1.2.4 Morphologie et organisation du génome du VIB

1.2.4.1 Morphologie du VIB

Le VIB est un virus enveloppé de 120-130 nm de diamètre avec une structure similaire aux autres lentivirus (voir Figure 1). L'enveloppe virale est constituée de deux protéines, une de surface (SU), la gp100, et une transmembranaire (TM), la gp45. L'enveloppe virale porte des projections de 10 nm de diamètre (Gonda et al., 1987). Elle recouvre la capsid (CA), constituée de la protéine p26, et la nucléocapside (NC), constituée de la protéine p7. La nucléocapside protège le génome viral (Gonda et al., 1994; St-Louis, Cojocariu et Archambault, 2004).

Le génome du VIB comporte deux molécules d'ARN simple brin à polarité positive d'environ 8,5 kb associés aux protéines p7 et p13 et à une molécule d'ARNt qui sert d'amorce pour la synthèse du provirus (Gonda et al., 1994). Les ARN forment des dimères grâce à l'interaction entre les deux séquences d'une région nommée «*dimer linkage structure*» (DLS). Les ARN génomiques des rétrovirus présentent des caractéristiques spécifiques des ARNm cellulaires comme une coiffe à l'extrémité 5' (m7G5') et une queue polyA à l'extrémité 3' (environ 200 nt) (Goff, 2007). Cette ressemblance avec les ARN cellulaires protège les ARN rétroviraux des attaques des nucléases cellulaires une fois qu'ils sont rentrés dans la cellule hôte.

Le génome du VIB possède les gènes structuraux rétroviraux obligatoires : *gag*, *pol* et *env*, et les longues répétitions terminales (LTR pour « long terminal repeat ») localisées à chacune des extrémités du génome (voir Figure 1.1). Le génome contient aussi six gènes accessoires non structuraux : *vif*, *tat*, *rev*, *vpw*, *vpy* et *tmx* (Gonda et al., 1987; Garvey et al., 1990; Oberste, Greenwood et Gonda, 1991; Oberste et Gonda, 1992; Oberste et al., 1993; Gonda et al., 1994; Belloc et al., 1996).

1.2.4.2 Les LTR du VIB

La régulation de la réplication du VIB est dépendante de facteurs cellulaires et viraux qui sont capables d'interagir avec les LTR viraux. L'organisation des LTR du VIB est similaire aux autres rétrovirus et contient les régions U3, R et U5 (Goff, 2007). Le LTR est localisé à chaque extrémité du génome proviral. Chaque LTR contient de 587 à 589 nucléotides (nt) pour les clones moléculaires VIB R-29 127 et VIB R-29 106, respectivement (Garvey et al., 1990). Les LTR du VIB contiennent des séquences de liaison pour des facteurs de transcription eucaryotiques comme NF- κ B, Sp1, AP-1, AP-4, TATA et CAAT. Tous ces éléments sont essentiels pour la fonction du LTR du VIB (Corredor, St-Louis et Archambault, 2010). La région U3 des LTR contient les signaux d'initiation, d'amplification « *enhancer* » et de terminaison de la transcription. À la jonction U3-R se trouve le site d'initiation de la transcription +1. Dans la région R se trouve la séquence TAR (élément de réponse à Tat) qui est présente dans tous les transcrits viraux. La protéine Tat se lie à TAR et augmente l'expression des différents gènes viraux. Tous les transcrits viraux ont des régions non traduites que sont la séquence leader présente dans U5 et une queue polyA transcrite à partir du LTR en 3' (Gonda et al., 1994; Corredor, St-Louis et Archambault, 2010).

Une nouvelle séquence de LTR (LTRn) a été identifiée récemment. Elle a été obtenue à partir de virions originaire de la rate de lapins quelque 3 ans suivant une

infection expérimentale. À la différence du LTR sauvage (WT « *wild type* »), le LTRn contient dans sa région U3 deux mutations aux positions -135 et -114 qui provoquent *in vitro* une activité transcriptionnelle de la protéine Tat plus forte que le LTR WT (Cojocariu, St-Louis et Archambault, 2009).

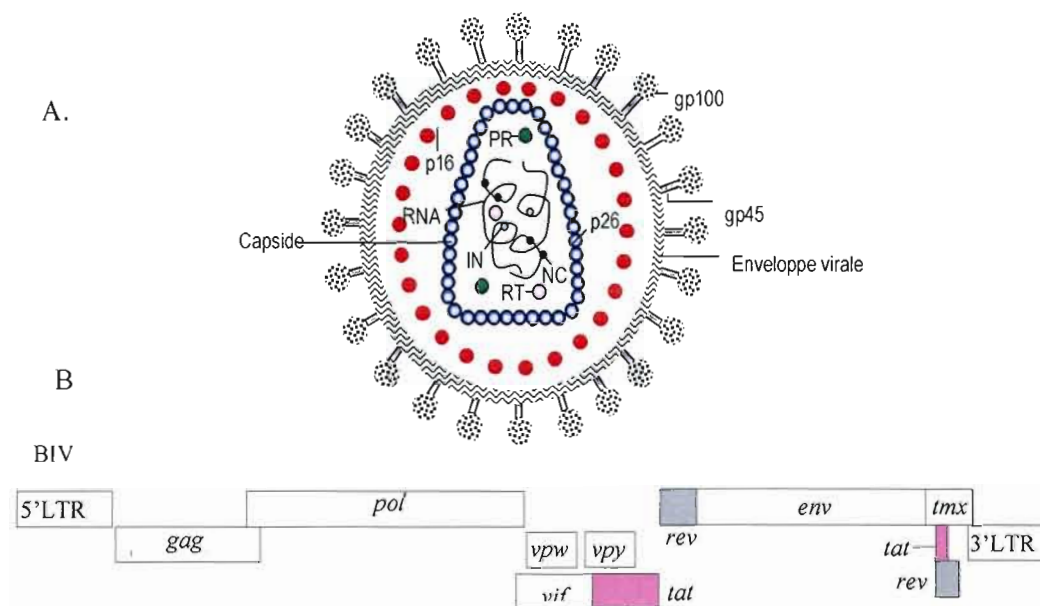


Figure 1.1 Morphologie du VIB. Schéma de la morphologie du VIB. L'enveloppe virale est composée de la glycoprotéine de surface gp100 et de la glycoprotéine transmembranaire gp45. La matrice virale est constituée par la protéine p16. La capside est composée de la protéine p26 et renferme les deux molécules d'ARN, la protéase PR, l'intégrase IN, la transcriptase inverse RT et la nucléocapside NC. B. Le génome proviral du VIB; composé des deux LTR localisés dans les extrémités du génome, les trois gènes structuraux gag, pol et env et les six gènes accessoires : vif, vpr, vpx, tat, rev, tmx. (St-Louis, Cojocariu et Archambault, 2004; Desrosiers, 2007; Goff, 2007)

1.2.4.3 Les gènes structuraux

Les gènes structuraux du VIB (gag, pol et env) codent pour les précurseurs des polyprotéines qui génèrent les protéines structurales Gag et Env et les enzymes virales (transcriptase inverse, intégrase et protéase).

gag. Le gène *gag* (pour *group antigen-associated gene*) est localisé en position 3' du LTR 5' et code pour un précurseur protéique Gag (Gag Pr53) qui sert à l'assemblage de l'ARN génomique et à la formation de la particule virale (Battles et al., 1992). Le précurseur Gag chez le VIB est clivé par la protéase virale, de sorte que trois protéines principales sont générées : la protéine de la matrice (MA) ou p16, de la capsid (CA) ou p26 et de la nucléocapside (NC) ou p13. Trois autres petites protéines p2L, p3 et p2 sont aussi générées (Rasmussen et al., 1990; Battles et al., 1992; Tobin et al., 1994). La protéine MA est associée à la couche interne de l'enveloppe virale tandis que la protéine CA forme une coquille qui entoure le complexe ARN-NC et contient des épitopes majeurs reconnus par les anticorps de l'hôte (Whetstone, VanDerMaaten et Miller, 1991; Atkinson, Liu et Wood, 1992). Le précurseur Gag Pr53 contient également une séquence d'espacement entre CA et NC ainsi qu'un motif en doigt de zinc qui permet la liaison à l'ARN génomique pour former la nucléocapside et qui est essentiel à l'assemblage du VIB (Gonda et al., 1994; Guo et al., 2004).

pol. La séquence du gène *pol* chevauche celle du gène *gag*. Le gène *pol* code pour un précurseur protéique Pr170. Pendant la transcription du gène *gag*, un décalage de -1 nucléotide dans le cadre de lecture permet la transcription du gène *pol* (Battles et al., 1992). Le précurseur Pr170 est clivé par des protéases cellulaires en trois protéines : la protéase (PR), la transcriptase inverse (RT) et l'intégrase (IN) (Gonda et al., 1994). La fonction de la PR est de cliver le précurseur Gag53. Pour tous les lentivirus, la RT a deux fonctions : une de polymérase pour la synthèse de l'ADN à partir de l'ARN génomique viral et une de RNase H pour la dégradation de l'ARN génomique viral une fois que le premier brin de l'ADN est produit (Clements et Zink, 1996; Avidan, Bochner et Hizi, 2006). La RT du VIB semble être moins fidèle que la RT du VIH-1. Deux types de RT ont été décrits chez le VIB, une forme courte ou RT-1 composée de 546 acides aminés (aa) et une forme longue RT-2 de 620 aa (Avidan, Bochner et Hizi, 2006). La forme RT-2 est fonctionnellement moins active que l'isoforme courte.

Une explication possible est que les 74 aa supplémentaires localisés dans la partie C-terminale de RT-2 peuvent affecter la fonction catalytique de l'enzyme (Avidan, Bochner et Hizi, 2006). En plus, cette séquence de 74 aa montre une homologie avec la deoxyuridine 5'-triphosphate pyrophosphatase (dUTPases) des autres lentivirus comme VIF et EIAV (Elder et al., 1992; Threadgill et al., 1993). Cependant, la fonction biologique des 74 aa supplémentaires de RT-2 est inconnue. Finalement, plusieurs isoformes de l'IN du BIV ont été décrites. L'IN est capable d'identifier l'ADN proviral produit par la RT et de l'intégrer dans le génome de la cellule hôte (Avidan et Hizi, 2008). D'autre part, le co-activateur transcriptionnel LEDGF/p75, un des principaux partenaires cellulaires de l'IN du VIH-1, interagit aussi avec l'IN du VIB et est nécessaire pour une réplication virale efficace (Cherepanov, 2007; Engelman et Cherepanov, 2008).

env. Le gène *env* code pour un précurseur protéique, le Pr145 (145 kDa). Le précurseur Pr145 est clivé par des protéases cellulaires en deux protéines de l'enveloppe virale, la gp100 (SU) et la gp 45 (TM) (Rasmussen, Greenwood et Gonda, 1992). Les protéines SU et TM sont liées par un pont disulfure. La protéine SU est nécessaire à la liaison avec les récepteurs de la cellule hôte et de cette façon détermine le tropisme cellulaire du virus. La protéine TM permet l'ancrage du complexe Env dans la bicouche lipidique et facilite la fusion entre les membranes virale et cellulaire (Goff, 2007). La protéine TM serait responsable de la formation de syncytia dans les cellules en culture infectées par VIB (Gonda et al., 1994; Chirmule et Pahwa, 1996).

Une réponse immunitaire avec production d'anticorps est une des caractéristiques de l'infection par le VIB. De la même façon que la protéine de capsid p24 du VIH chez l'homme (Gaines et al., 1987), la protéine de capsid du VIB est associée à l'induction d'une forte réponse immunitaire chez les animaux infectés expérimentalement avec le VIB (Whetstone, VanDerMaaten et Black, 1990).

Toutefois, la réactivité immunitaire générée par p26 décroît avec le temps, jusqu'à des niveaux non détectables 1,5 à 2,5 ans après l'infection. Par contre, les anticorps dirigés contre la protéine TM, qui apparaissent plus tard que ceux dirigés contre p26, persistent pour plus de 3,5 à 4 ans chez les animaux infectés par le VIB (Isaacson et al., 1995; Abed et al., 1999; Abed et Archambault, 2000).

1.2.4.4 Les gènes accessoires

En plus des gènes structuraux, les lentivirus ont deux gènes régulateurs et jusqu'à quatre gènes accessoires. Les gènes régulateurs et accessoires du VIB au nombre de six sont localisés entre le gène *pol* et l'extrémité 3' du génome viral et sont nommés *tat*, *rev*, *vif*, *vpw*, *vpy* et *tmx* (Gonda et al., 1987; Garvey et al., 1990; Oberste, Greenwood et Gonda, 1991; Oberste et Gonda, 1992; Oberste et al., 1993; Gonda et al., 1994) (voir Figure 1.1). Chez les lentivirus, l'ensemble de ces gènes régule la transcription, la traduction et différents aspects de la pathogenèse virale (Cullen, 1991).

tat. Le gène *tat* code pour la protéine Tat (p14) du VIB qui est traduite à partir d'un ARNm épissé composé d'une séquence leader non traduite (exon 1) et de deux exons (exons 2 et 3) (Liu, Sheridan et Wood, 1992; Pallansch, Lackman-Smith et Gonda, 1992; Fong et al., 1995; Fong et al., 1997). L'exon 2 produit une protéine de 103 aa (Tat 103), laquelle est suffisante pour activer le LTR du VIB (Fong et al., 1997). Néanmoins, l'épissage alternatif peut générer plus d'une forme d'ARN de *tat*. Chez le VIB, les protéines Tat 108 (108 aa) et Tat 236 (236 aa) ont été décrites (Fong et al., 1997; St-Louis, Abed et Archambault, 2005). La protéine Tat 108 est composée des premiers 98 aa codés par l'exon 2 et de 10 aa codés par l'exon 3. La protéine Tat 236 est composée des premiers 98 aa de la Tat 103 ou 108 et de 130 aa codés à partir de la séquence du gène *rev* (St-Louis, Abed et Archambault, 2005).

Tat est la protéine du VIB la plus étudiée jusqu'à maintenant et ses domaines fonctionnels ont été très bien caractérisés (Liu, Sheridan et Wood, 1992; Chen et Frankel, 1994; Fong et al., 1997). Tat du VIB est une phosphoprotéine localisée dans le noyau et le nucléole des cellules infectées. Le rôle principal de la protéine Tat est la transactivation du LTR afin d'augmenter et réguler l'expression virale. La protéine Tat se lie sur l'élément de réponse à Tat (TAR) dans le LTR pour accomplir sa fonction (Fong et al., 1995; Fong et al., 1997). La protéine Tat 236 a une activité transactivatrice du LTR du VIB plus forte que les protéines Tat 103 et Tat 108 (jusqu'à 3 fois), et la présence du domaine basique de Rev est responsable de l'activité accrue de Tat236 (St-Louis, Abed et Archambault, 2005).

La protéine Tat du VIB affecte également la modulation de l'expression de gènes cellulaires et induit l'apoptose (Gunnery, Green et Mathews, 1992; McCloskey et al., 1997). Des études récentes *in vitro* ont démontré que la protéine Tat du VIB est capable d'induire l'apoptose par l'altération de la dynamique des microtubules (Xuan et al., 2008). L'induction de l'apoptose par la protéine Tat du VIH-1 a été démontrée par l'activation de la cytokine TRAIL (« Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Induced Ligand ») dans des cellules mononucléaires sanguines. TRAIL est capable de détruire les cellules non infectées via le réseau des microtubules. Tat du VIH-1 de fait est capable de se lier au complexe microtubules/tubuline par son domaine central et de stimuler la voie apoptotique dépendante des mitochondries (de Mareuil et al., 2005; Giacca, 2005; Huo et al., 2011). Tat peut également produire l'activation de Bim qui appartient à la famille des facteurs pro-apoptotiques Bcl-2 et qui est un transducteur des signaux de mort (Chen et al., 2002).

Il a été démontré *in vitro* que la protéine Tat du VIB, comme celle du VIH, en fusion avec la GFP, a un effet paracrine. Elle est capable d'entrer dans les cellules grâce à son domaine riche en arginines, d'activer le LTR et moduler la transcription, dépendante du facteur NF- κ B. Ces résultats suggèrent que Tat du VIB serait capable

de modifier l'environnement cellulaire pour faciliter la réplication et la dispersion du virus (Deng et al., 2008). Ce mécanisme d'action de Tat a été aussi rapporté pour les protéines Tat des virus VIH-1 et JDV (Frankel et Pabo, 1988; Futaki et al., 2001; Deng et al., 2006). Tat du VIH-1 est libérée dans le milieu extracellulaire par les cellules infectées et est probablement capable d'exercer des activités paracrines et autocrines pour faciliter la survie, la dispersion et la pathogénicité du VIH. Tat du VIH-1 est assimilée par un mécanisme d'endocytose, par les cellules grâce à son domaine riche en arginines (ou ARM : RKRRQR) (Jeang, Xiao et Rich, 1999). Tat VIH-1 peut rentrer dans des cellules infectées non actives, aller au noyau et activer la transcription des différents gènes viraux ou entrer dans des cellules non infectées et activer l'expression des gènes cellulaires comme l'interleukine 6 (IL-6), le facteur de nécrose tumorale alpha (TNF α) et le facteur nucléaire NF-kB. Tat VIH-1 est également capable de stimuler l'angiogenèse par les cellules endothéliales suite à une interaction avec le facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF) (Seelamgari et al., 2004).

rev. Le gène *rev* est aussi impliqué dans la régulation de l'expression des gènes viraux. La protéine Rev est produite à partir d'un ARNm multi-épissé qui contient la séquence leader non traduite (exon 1) et 2 exons codants (exons 2 et 3) localisés de chaque côté du gène *env* du génome proviral du VIB (Oberste et al., 1993). La protéine est produite dans la première phase de l'infection et est présente chez tous les lentivirus (Oberste et al., 1993). La protéine Rev du VIB (23 kDa) est une phosphoprotéine de 186 aa qui est localisée dans le noyau et le nucléole des cellules infectées (Oberste et al., 1993). Elle est prédite pour accomplir la même fonction essentielle que celle de Rev du VIH-1 (Oberste et al., 1993). Rev du VIH-1 a pour fonction primordiale le transport des ARNs non épissés et partiellement épissés du noyau vers le cytoplasme via sa liaison avec le RRE qui est présent dans tous ces ARN viraux (Pollard et Malim, 1998) (en détail plus loin). Le RRE a été localisé dans l'intron du gène *env* et est composé de 312 nucléotides (nt) (Molina et al., 2002). Les

séquences nécessaires pour la liaison de Rev ou encore la prédiction de la structure secondaire du RRE ne sont pas encore élucidées.

***vif*.** Le gène *vif* du VIB produit une protéine de 23 kDa. La fonction spécifique de Vif dans le VIB n'est pas connue mais la présence de motifs conservés entre les différents lentivirus suggère une conservation de sa fonction (Gonda et al., 1994). Vif aide à l'assemblage de nouvelles particules virales chez le VIH, mais sa principale fonction est d'inhiber la protéine cellulaire nommée APOBEC3G. Cette protéine est capable de produire la déamination du génome viral, donc une hypermutation, et la dégradation du génome grâce à l'action des « uracile DNA glycosidase » cellulaires. (von Schwedler et al., 1993; Hoglund et al., 1994). De plus, Vif stabiliserait le complexe proviral pendant le début de la rétrotranscription et serait important pour la répllication *in vivo* du virus CAEV (Harmache et al., 1995; Seelamgari et al., 2004).

***tmx*.** Le gène *tmx* (Transmembranaire x, en référence à sa localisation dans le génome) est localisé entre la région codant pour la protéine TM et le LTR en 3' et code pour une protéine de 19 kDa. Sa fonction chez le VIB n'est pas connue, mais *tmx* serait un équivalent de *nef*, retrouvé chez les lentivirus primates. La protéine Nef est considérée comme un marqueur spécifique de la maladie *in vivo*. En effet, la perte de la fonction de Nef est associée à une baisse de la charge virale chez les personnes séropositives et la non progression du SIDA. Sa fonction est capitale pour la coordination efficace de la rétrotranscription et de la diminution des récepteurs CD4 et des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I. Nef a aussi la capacité d'augmenter l'infectivité du virus et de moduler les voies de signalisation dans les lymphocytes et les macrophages (Schwartz et al., 1995; Marsh, 1999; Seelamgari et al., 2004).

***vpw et vpy*.** Les gènes *vpw* et *vpv* sont présents uniquement chez le VIB. Ces gènes sont localisés dans la partie centrale du génome. Leur fonction est inconnue

mais leur localisation dans le génome suggère une homologie fonctionnelle avec les protéines Vpu et Vpr du VIH avec une homologie de séquence de 68% et 47% respectivement. La protéine Vpu a deux principales fonctions dans le cycle viral : elle induit la dégradation des récepteurs CD4 par la voie de l'ubiquitine et augmente la libération des virions à partir des cellules infectées (Schubert et al., 1998; Seelamgari et al., 2004). La protéine Vpr transporte au noyau le complexe de pré-intégration au début de l'infection. Dans l'étape tardive de la réplication virale, elle est responsable de l'arrêt du cycle cellulaire (Gragerov et al., 1998; Seelamgari et al., 2004).

1.2.5 Cycle viral

Le VIB est un rétrovirus exogène avec un cycle de réplication virale similaire aux autres lentivirus (voir Figure 1.2). Le cycle viral débute par l'interaction de la protéine de surface SU avec le récepteur cellulaire. Même si dans le cas du VIB le récepteur n'a pas été bien décrit, sa ressemblance avec le VIH suggère qu'il s'agit du récepteur CD4 présent sur la membrane des cellules cibles et de co-récepteurs. Les virus VIS et le VIF utilisent aussi les récepteurs CD4 pour l'entrée du virus (Desrosiers, 2007). Les co-récepteurs sont des récepteurs naturels aux chimiokines β appartenant à une famille de protéines à sept domaines transmembranaires et associées à des protéines G. Les plus connues sont la fusine, ou CXCR4, et CCR5. Les lymphocytes T primaires et les cellules dendritiques possèdent les co-récepteurs CXCR4 et CCR5 alors que les lignées T expriment exclusivement CXCR4 et les macrophages, CCR5. Le VIH est divisé en deux types de souches : R5 (CCR5) et R4 (CXCR4) (Berger et al., 1998). La molécule CCR5 est le principal co-récepteur pour le VIH (Alkhatib et al., 1996; Clapham et McKnight, 2002). Une étude a démontré que les fibroblastes de poumon bovin présentent le récepteur CCR5 et que le VIB utiliserait ce récepteur pour entrer dans la cellule hôte (Wright, Mleczko et Coats, 2002).

La liaison de SU avec le récepteur déclenche le changement final de conformation de la glycoprotéine virale de surface, permettant à la protéine transmembranaire TM de s'insérer dans la membrane cellulaire et d'induire le processus de fusion membranaire. De la même façon que le VIH, après la pénétration du virus dans la cellule hôte, les protéines Env resteraient insérées dans la bicouche lipidique à la surface de la cellule infectée, alors que le nucléoïde viral est libéré dans le cytoplasme. Le nucléoïde est constitué de la protéine CA, de la protéine NC et de l'ARN génomique viral et est nommé nucléo-complexe (Goff, 2007). Enfin, la décapsidation du virus, par dissociation des protéines de la capsid, permet au matériel génétique de se retrouver directement en contact avec le cytosol. Avant l'insertion dans le génome de la cellule hôte, l'ARN viral doit subir une étape de transcription inverse (Gonda et al., 1994).

Le génome viral est composé de deux molécules d'ARN simple brin, avec la présence d'une molécule d'ARNt^{Lys} cellulaire qui sert d'amorce à la RT pour la synthèse de l'ADN à partir de l'ARN viral. L'ARNt^{Lys} contient un triplet de nucléotides qui est complémentaire à un triplet dans le génome d'ARN viral (Goff, 2007). Le processus de transcription inverse est commun à tous les rétrovirus, mais la structure et la séquence des aa de la RT est variable (Quinones-Mateu et al., 1996; Cooper et al., 1999). La transcription inverse est la synthèse d'un ADN double brin à partir du brin d'ARN. Ce phénomène est couplé à la dégradation de l'ARN d'origine. Cette étape est initiée dans la particule virale et s'achève dans le cytoplasme de la cellule infectée (Zhang et al., 1993).

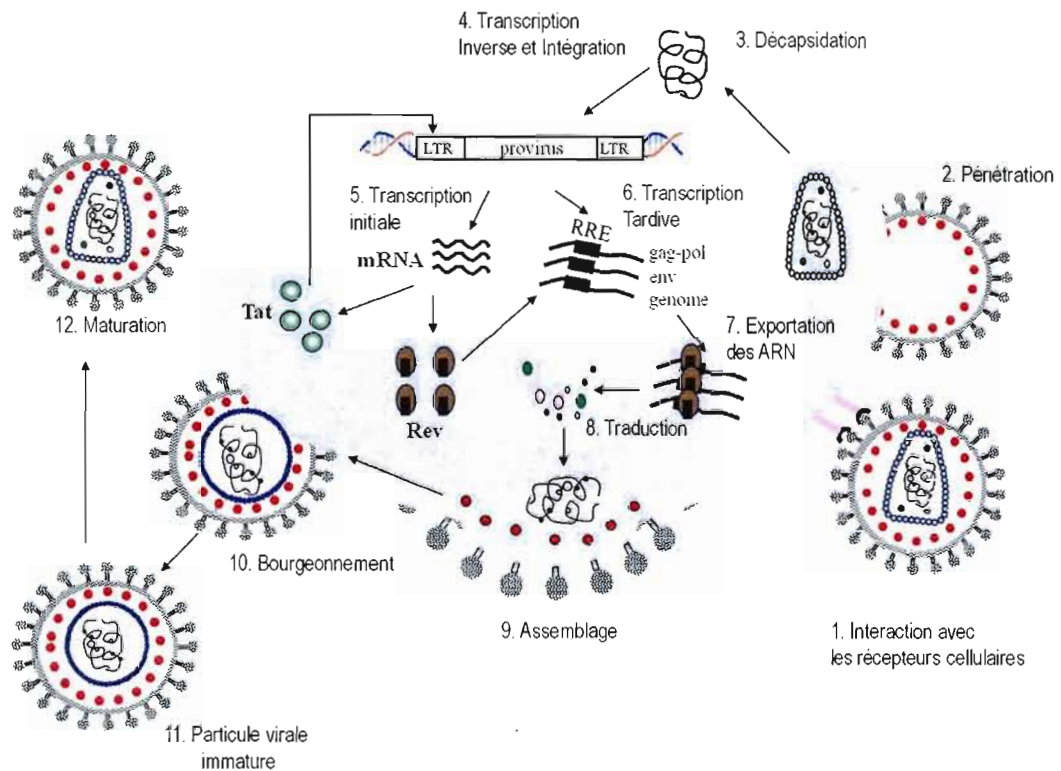


Figure 1.2. Cycle de réplication des lentivirus. 1. Les particules virales interagissent avec les récepteurs cellulaires. 2. La membrane cellulaire et l'enveloppe virale fusionnent, ce qui permet la pénétration de la capside virale. 3. La décapsidation libère le génome viral dans le cytoplasme. 4. L'ARN viral est rétrotranscrit et l'ADN proviral est intégré dans le génome cellulaire. 5. La transcription initiale du génome proviral permet la production des protéines régulatrices Tat et Rev. 6. Transcription tardive : Tat transactive le LTR et active la transcription des gènes structuraux et accessoires. 7. Transport au cytoplasme des ARN dépendants de Rev. 8. Traduction des protéines structurales. 9. Assemblage des virions. 10. Libération des particules virales par bourgeonnement. 11 et 12. Maturation des particules virales (St-Louis, Cojocariu et Archambault, 2004).

La première étape de la transcription inverse est l'alignement de l'ARN^{t^{Lys}} au site localisé à la fin de l'extrémité 5' du génome viral (séquence PBS) (Le Grice, 2003). L'enzyme RT forme un complexe avec l'ARN^{t^{Lys}} et la rétrotranscription commence au niveau du site de liaison de l'amorce jusqu'à la coiffe 5' du génome viral (Voir Figure 1.3). Ce premier ADN simple brin (ADNss) sert d'amorce pour compléter la

transcription du génome viral. Le domaine RNase H de la RT dégrade l'ARNt^{Lys} et libère l'ADNss. L'ADNss est complémentaire à la région 3'R et sert d'amorce pour la synthèse complète de l'ADN viral simple brin à polarité négative (Berkhout et al., 2001; Goff, 2007). L'ARN viral est dégradé après la synthèse de l'ADNss, mais la séquence de polypurines localisée dans la région U3 de l'extrémité 5' n'est pas dégradée (Roda et al., 2003). Cette séquence d'ARN sert d'amorce pour la synthèse du brin positif de l'ADN. Le processus de génération de l'ADNss positif à partir de l'ADNss négatif est aussi réalisé par la RT (Roda et al., 2003; Goff, 2007).

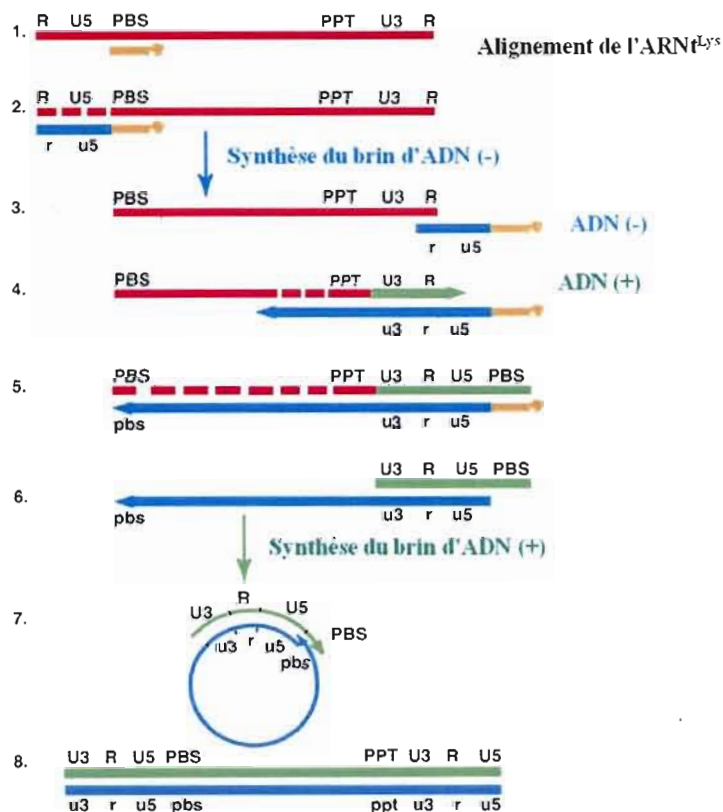


Figure 1.3. Rétrotranscription des lentivirus. 1. Alignement de l'ARNt^{Lys} à la séquence PBS. 2. Rétrotranscription du brin d'ADNss (-) et dégradation par la RNase H de la RT des régions de l'ARN viral 5' R et U5. 3. Le brin d'ADNss (-) est transféré à l'extrémité 3' de l'ARN viral est serve comme amorce pour compléter la rétrotranscription du brin d'ADNss (-). 4. Rétrotranscription du brin d'ADNss (-) et dégradation par la RNase H de la RT de l'ARN viral. 5. La région PPT du génome sert comme amorce pour la synthétise l'ADNss (+) des régions U3, R et PBS de

l'extrémité 3'. 6. Dégradation par la RT des amorces ARNt^{Lys} et PPT. 7. Circularisations du brin d'ADN (-) et synthèse du brin d'ADN (+). 8. ADN double brin proviral. Adapté de (Goff, 2007).

Trois formes d'ADN non intégrés sont présents après la réaction de rétrotranscription et peuvent coexister dans le noyau : une version linéaire double brin limitée de chaque côté par les LTR, une version circulaire de l'ADN avec seulement une copie de LTR et une version circulaire connue comme la jonction LTR-LTR qui est produite par la ligation des extrémités LTRs du double brin de l'ADN. La version linéaire double brin est la plus efficace comme substrat pour l'intégration (Goff, 2007).

Concernant le processus de transcription inverse, il est à l'origine d'une partie de la variabilité génétique des rétrovirus. En effet, contrairement aux ADN polymérases cellulaires, la transcriptase inverse du VIH-1 est dépourvue d'activité exonucléase, ce qui ne lui permet pas de corriger les mutations générées au cours de la synthèse de l'ADN viral (Mansky, 1996). La RT du VIB semble être encore moins fidèle que la RT du VIH (Avidan, Bochner et Hizi, 2006) (Meas et al., 2001).

Chez le VIH-1, l'ADN double brin viral, nommé provirus, est transporté au noyau grâce à l'intervention de la protéine Vpr qui fait une liaison avec les nucléoporines et qui permet l'importation nucléaire (Subbramanian et al., 1998; Goff, 2007). L'intégrase (IN) permet l'intégration du provirus dans l'ADN cellulaire. L'intégration de l'ADN dépend de deux événements clés. D'abord, l'IN enlève deux nucléotides de l'extrémité 3' du LTR de l'ADN double brin proviral, les nucléotides « CA » étant conservés à l'extrémité 3' de tous les rétrovirus. Ensuite, l'hydrolyse génère des extrémités nécessaires pour faire la liaison entre l'extrémité 3' de l'ADN proviral et l'extrémité 5' de l'ADN cellulaire (Chiu et Davies, 2004; Vandegraaff et Engelman, 2007). Le site d'intégration de l'ADN viral dans l'ADN cellulaire ne semble pas très spécifique, mais cette insertion est généralement observée dans les régions transcrites

spécifique, mais cette insertion est généralement observée dans les régions transcrites de la chromatine (Bushman, 2002). L'ADN proviral, une fois inséré dans le génome cellulaire, peut rester silencieux jusqu'à ce que l'expression des gènes viraux soit activée par des signaux ou facteurs externes comme les interleukines (IL-1, IL-2) et TNF α . (Goff, 2007)

L'ADN proviral est exprimé par la machinerie cellulaire. L'expression des gènes viraux dans la cellule est contrôlée par deux mécanismes. Le premier est en relation avec la configuration de la chromatine : la transcription est affectée par le niveau de méthylation de l'ADN, les régions transcriptionnellement actives étant hypométhylées (Schroder et al., 2002). Le deuxième niveau de contrôle est lié au processus de transcription : la transcription implique l'interaction d'un des trois types d'ARN polymérase cellulaire avec un gène spécifique. L'initiation de la transcription est influencée par des facteurs spécifiques de transcription, la taille et la flexibilité de l'ADN (Goff, 2007).

La transcription initiale des ARNm du provirus est régulée par des facteurs constitutifs de la cellule hôte. Chez le VIH, les facteurs de liaison à la boîte TATA, Sp1 et les facteurs de transcription de la famille NF- κ B vont se lier sur le LTR (Cullen et Greene, 1989). La transcription de l'ADN proviral génère trois types d'ARNm (non-épissés, mono-épissés et multi-épissés) qui peuvent être classés selon deux étapes durant l'infection : initiale et tardive. L'étape initiale se caractérise par la production des ARNm multi-épissés qui codent pour des protéines régulatrices non structurales comme Tat et Rev (Saltarelli et al., 1996). L'expression de tous les ARNm du virus dépendent de la production de Tat. La phase tardive de la réplication est caractérisée par la production des ARNm non-épissés et mono-épissés (Saltarelli et al., 1996). Ces ARN codent pour les gènes *gag*, *pol* et *env* qui produisent les protéines structurales et les glycoprotéines nécessaires à l'assemblage de nouvelles

particules virales. Les gènes accessoires sont aussi transcrits pendant cette étape et aident à l'assemblage, à l'infectivité et à la pathogenèse virale (Saltarelli et al., 1996).

La formation des nouveaux virions et leur libération par la cellule hôte sont les dernières étapes du cycle de réplication des lentivirus. L'assemblage du virion s'organise sous la membrane plasmique et comprend les deux brins d'ARN viral, les protéines générées à partir des précurseurs Gag et Pol et l'insertion des glycoprotéines Env dans la membrane cellulaire qui permet la formation de l'enveloppe virale (Hermida-Matsumoto et Resh, 2000). Dans le cas du VIH-1, les processus de formation et de libération des virions sont réalisés par le précurseur Gag qui est capable de produire une particule virale sans l'aide des autres protéines virales ou cellulaires (Gheysen et al., 1989). La formation et la libération des virions sont faites par un processus de bourgeonnement (Katsumoto, Hattori et Kurimura, 1987; Bukrinskaya, 2004). Les particules virales immatures suivent un processus de maturation par lequel la capsidie obtient sa conformation finale. La formation de la capsidie est un événement crucial dans la réplication virale (Forshey et al., 2002). Une fois matures, les particules virales recommencent le cycle de réplication par l'infection des cellules voisines non infectées (Goff, 2007).

1.3 LA PROTÉINE REV DU VIH-1

La protéine Rev est produite dès la première phase de l'infection et est présente chez tous les lentivirus. Deux fonctions importantes ont été attribuées à Rev : un rôle dans l'épissage et l'exportation des ARNm (Pollard et Malim, 1998). La protéine Rev du VIH-1 (18 kDa) est nécessaire pour l'expression des protéines structurales pendant la phase tardive de l'infection par le VIH-1 et la production des nouvelles particules virales (Pollard et Malim, 1998; Hope, 1999). La protéine Rev du VIH-1 est capable d'exporter les ARNm grâce à quatre principaux domaines fonctionnels : le domaine riche en arginines (ARM, « *arginine rich motif* ») qui contient les signaux de localisation au noyau (NLS, « *nuclear localization signal* ») et au nucléole (NoLS,

« *nucleolar localization signal* ») en plus du domaine de liaison à l'ARN (RBD, « *RNA binding domain* »), deux domaines de multimérisation localisés de chaque côté de l'ARM ; et finalement, un domaine d'exportation nucléaire (NES, « *nuclear exportation signal* ») (Pollard et Malim, 1998).

Différents groupes ont démontré que la protéine Rev du VIH est essentielle pour l'accumulation des ARNm non épissés (9 kb) et mono-épissés (4 kb) dans le cytoplasme (Pollard et Malim, 1998). Les ARNm multi-épissés (2kb) se retrouvent au contraire dans le cytoplasme en présence ou en absence de Rev (Pollard et Malim, 1998) (voir figure 1.4B).

Du fait que les ARNm de 9 kb et 4 kb codent pour les protéines Gag, Pol, et Env, l'accumulation de ces ARNm démontre l'importance du rôle de Rev dans l'expression des protéines structurales du virus et la réplication virale. Les ARNm de 2 kb codent pour les protéines Tat, Nef et Rev et sont accumulés dans le cytoplasme avant les ARNm de 9 et 4 kb. À partir de ces données, l'expression des gènes du VIH est divisée en deux catégories : phase initiale, ou Rev-indépendante, et phase tardive, ou Rev-dépendante (voir Figure 1.4) (Pollard et Malim, 1998). La protéine Rev transporte les ARNm non-épissés ou mono-épissés au cytoplasme grâce à l'interaction avec le RRE qui se trouve dans l'intron du gène *env* et de cette façon dans tous les ARNm de 9 et 4 kb (Olsen et al., 1990).

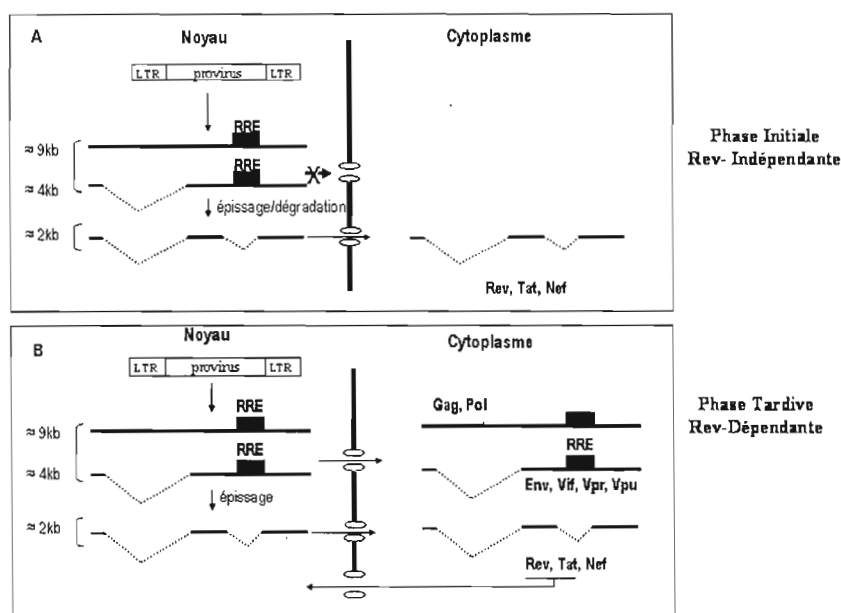


Figure 1.4. Phases initiale et tardive de l'expression des ARNm du VIH-1. A. En absence de Rev, les longs ARNs sont dégradés et/ou épissés. B. En présence de Rev les longs ARNs (9 et 4 kb) sont transportés au cytoplasme pour être traduits. Adaptée de Pollard et Malim, 1998.

1.3.1 L'élément de réponse à Rev ou RRE

Le RRE du VIH-1 est une structure d'ARN de 351 nucléotides (Olsen et al., 1990; Mann et al., 1994) qui a été très étudiée. Les analyses de la structure secondaire du RRE ont prédit une structure complexe composée de tiges et de boucles (voir Figure 1.5). La validité de la structure a été confirmée dans des études *in vitro* et *in vivo* (Kjems et al., 1991; Charpentier, Stutz et Rosbash, 1997). Différentes études de mutagenèse du RRE (Heaphy et al., 1990; Holland et al., 1990; Dayton et al., 1992) et d'analyses de liaison *in vitro* (Cook et al., 1991) ont démontré que la région essentielle du RRE pour l'interaction avec la protéine Rev est localisée dans les tiges

IIB et IID (voir Figure 1.5) (Battiste et al., 1996). Cependant le mécanisme d'assemblage du complexe Rev-RRE a généré beaucoup d'intérêt dernièrement et la structure du RRE a été réévaluée.

De nouvelles études ont démontré que le RRE contrôle et dirige l'assemblage d'homo-oligomères de Rev avec une affinité 500 fois plus grande que la liaison de la protéine Rev en forme de monomères sur la tige IIB (Daugherty, D'Orso et Frankel, 2008). Les domaines de multimérisation de Rev et le RRE sont nécessaires pour l'assemblage du complexe Rev-RRE *in vitro*, confirmant ainsi l'importance de ce complexe *in vivo* pour l'exportation de l'ARN et démontrant que la formation adéquate de complexes ARN-protéines, ou RNP, est essentielle pour la fonction biologique de Rev (Daugherty, D'Orso et Frankel, 2008). L'analyse cristallographique de complexes Rev-RRE, en utilisant une forme de Rev capable de former seulement des dimères, a démontré que l'oligomérisation et la liaison sur le RRE sont deux mécanismes physiquement associés. La structure de Rev obtenue pendant l'oligomérisation détermine l'orientation du ARM vers le RRE et facilite la liaison des dimères de Rev sur des régions différentes de la tige IIB du RRE (Daugherty et al., 2010; Daugherty, Liu et Frankel, 2010).

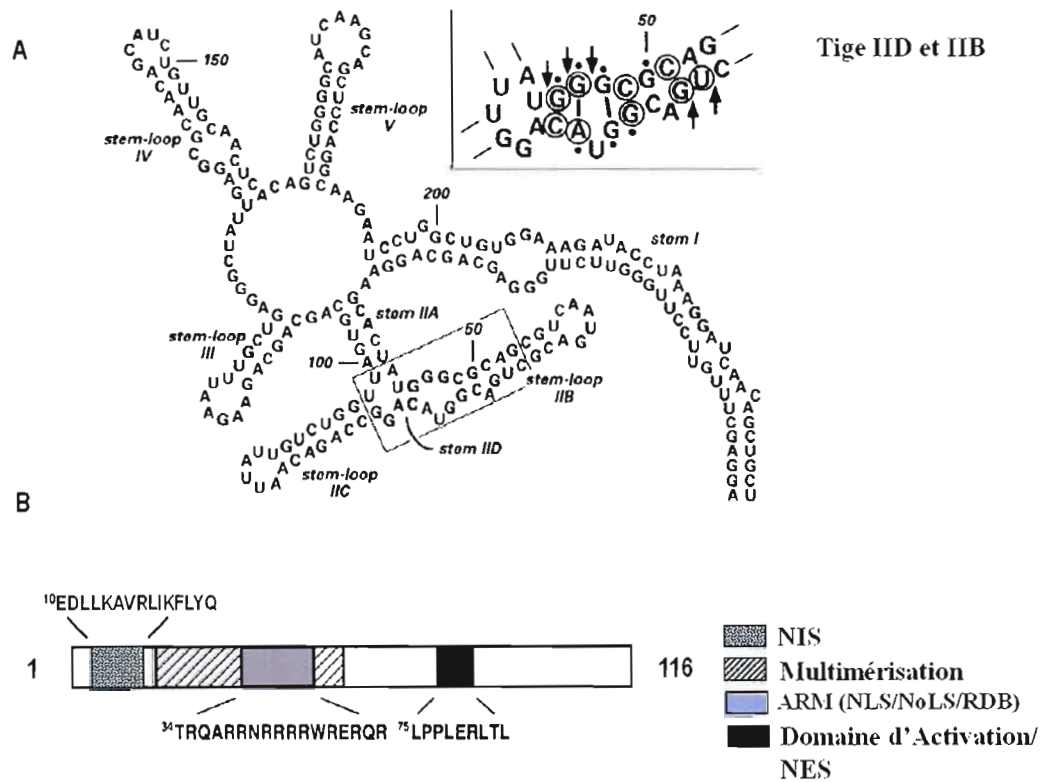


Figure 1.5. Structure du RRE et domaines structuraux de Rev du VIH-1. A. Structure de RRE, composée de 351 nt. Carré supérieur : tiges IID et IIB essentielles pour l'interaction de Rev. Les points indiquent les positions où une mutation affecte la liaison *in vitro*, les tirets indiquent les positions nécessaires à l'ouverture de l'hélice, et les flèches indiquent la position où le squelette sucre-phosphate peut changer. B. Domaines structuraux de Rev : domaine de Diffusion Nucléaire Inhibitoire (NIS, « Nuclear Diffusion Inhibitory Signal »), deux domaines de multimérisation, domaine riche en Arginine (ARM : dans ce domaine se trouvent les signaux de localisation nucléaire (NLS) et nucléolaire (NoLS). Domaine de liaison à l'ARN (RBD). Domaine d'activation ou domaine d'exportation du noyau (NES). Adapté de Pollard et Malim, 1998.

Le RRE sert de site d'attachement de Rev pour des ARN qui sont confinés au noyau. Cette hypothèse a été confirmée dans des études où la séquence de RRE a été transférée à des ARN hétérologues qui ont été reconnus par Rev du VIH-1 (Fischer et al., 1994; Stutz et Rosbash, 1994). La caséine kinase II phosphoryle la protéine Rev à

deux résidus sérine situés aux positions 5 et 8. La phosphorylation de résidus augmente la liaison Rev-RRE (Ji et Loeb, 1994; Fouts et al., 1997).

1.3.2 Domaines structuraux et fonctionnels de Rev

La protéine Rev du VIH-1, composée de 116 aa, est une phosphoprotéine de 18 kDa, capable d'aller au noyau, de se lier spécifiquement avec les ARN qui contiennent un RRE, de former des multimères et d'exporter les ARN viraux au cytoplasme (Pollard et Malim, 1998). La protéine Rev contient quatre domaines fonctionnels (voir Figure 1.5) : un domaine de diffusion nucléaire inhibiteur (NIS, « *Nuclear Diffusion Inhibitory Signal* ») en N-terminal, un ARM, deux domaines de multimérisation et un NES. Le domaine ARM est localisé entre les résidus 34 à 50 et sert de NLS et de NoLS (Kubota et al., 1989; Perkins et al., 1989) ainsi que de RBD (Bohnlein, Berger et Hauber, 1991).

Des études de résonance magnétique nucléaire ont démontré que quatre résidus arginine aux positions 35, 39, 40 et 44 participent au contact base-spécifique avec les tiges d'ARN de haute affinité IIB et IID du RRE, alors que d'autres résidus (thréonine à la position 34 et les arginines aux positions 38, 41 à 43, 46 et 48) sont en contact avec le squelette sucre-phosphate (Battiste et al., 1996).

Le domaine de multimérisation est localisé de chaque côté de l'ARM. La multimérisation de Rev est essentielle pour sa fonction (Zapp et al., 1991; Edgcomb et al., 2008; Daugherty, Liu et Frankel, 2010). Des études de liaison *in vitro* ont démontré qu'une seule molécule de Rev peut se lier sur le site de haute affinité du RRE (Cook et al., 1991; Cole et al., 1993; Brice, Kelley et Butler, 1999). D'autres molécules de Rev peuvent se lier et former des multimères via une combinaison des interactions protéine-protéine et protéine-ARN (Daly et al., 1993; Zimmel et al., 1996). Jusqu'à 13 molécules de Rev peuvent se lier sur un seul RRE (Madore et al.,

1994; Mann et al., 1994). Il a aussi été démontré que la protéine Rev peut former des multimères en l'absence de RRE *in vivo* (Hope et al., 1990b; Olsen et al., 1990; Bogerd et Greene, 1993; Daelemans et al., 2004) et *in vitro* (Cole et al., 1993).

Le NES initialement nommé domaine riche en leucines est localisé entre les résidus 75 et 83 (Fischer et al., 1995). Des analyses de mutagenèse de ce domaine ont démontré que cette région confère à Rev une fonction d'exportation (Hakata et al., 2002) par le biais de l'interaction du NES avec une protéine nécessaire au transport du noyau au cytoplasme, la protéine CRM1/exportine 1 (Fischer et al., 1995; Wen et al., 1995; Fornerod et al., 1997). Grâce à la découverte de la présence du NES dans Rev du VIH-1, le mécanisme cellulaire du transport des ARNs vers le cytoplasme a été élucidé et d'autres types de NES, différents des régions riches en leucine présentes dans la protéine Rev du VIH-1, ont été décrits (Kutay et Guttinger, 2005; Dong et al., 2009; Guttler et al., 2010).

Récemment, un domaine NIS a été identifié dans l'extrémité N-terminale de la protéine Rev du VIH-1. Le NIS est composé de 15 aa localisés entre les résidus 10 et 24 (EDLLKAVRLIKFLYQ). Ce domaine joue probablement un rôle important, car il maintient un nombre élevé de protéines Rev dans le noyau et augmente la stabilité intracellulaire de la protéine Rev (Kubota et Pomerantz, 2000). Sa délétion inactive Rev (Fang, Kubota et Pomerantz, 2002).

1.3.3 Cycle de transport nucléaire de Rev

Le cycle de transport de Rev du VIH-1 entre le noyau et le cytoplasme dépend de l'utilisation des voies d'importation et d'exportation cellulaire. La protéine Rev du VIH-1 est transportée au noyau par des voies différentes de la voie classique (voir ci-dessous). Des études *in vitro* ont démontré que plusieurs importines de la famille des karyophérines- β , comme l'importine 5, l'importine 7, l'importine 9, la transportine et

l'importine β , peuvent transporter Rev directement au noyau sans l'apport de l'importine α (Truant et Cullen, 1999; Arnold et al., 2006). Une étude *in vivo* a démontré que le principal récepteur dans les cellules HeLa pour le transport de Rev du VIH-1 au noyau est la transportine et que ce transport est facilité par la nucléoporine Nup358 qui fait partie du complexe du nucléopore ou NPC. Nup358 est également nécessaire à l'exportation de Rev (Hutten et al., 2009). Néanmoins, une étude encore plus récente chez d'autres types cellulaires a démontré que l'importine β était le principal récepteur *in vivo* (Gu et al., 2011).

L'exportation de Rev dépend de l'interaction avec des protéines de la famille des karyophérines- β aussi nommées exportines. La protéine CRM1 reconnaît le NES de la protéine Rev et est capable d'exporter le complexe Rev-RRE au cytoplasme. Dernièrement, la protéine Rev a suscité à nouveau l'intérêt et plusieurs études ont été publiées notamment pour caractériser l'interaction entre Rev et CRM1 mais aussi pour mettre en évidence le lien étroit entre la multimérisation de la protéine, l'interaction du RBD avec RRE et l'exportation par CRM1 du complexe Rev-RRE (Daugherty, D'Orso et Frankel, 2008; Monecke et al., 2009; Pond et al., 2009; Daugherty et al., 2010; Daugherty, Liu et Frankel, 2010; Guttler et al., 2010; Koyama et Matsuura, 2010).

Le cycle de transport de Rev via l'importine β et l'exportation par CRM1 sera décrit par la suite (Figure 1.6). L'importation nucléaire de Rev dépend entre autres de l'importine β dans le noyau. La protéine RanGTP (guanosine-5'-triphosphate) est aussi impliquée. Elle induit la dissociation du complexe importine β /Rev, libère le NLS/RBD de Rev et permet la formation du complexe Rev/RRE. L'interaction de l'importine β avec RanGTP permet aussi son exportation vers le cytoplasme. Dans le noyau, Rev forme un complexe avec le RRE, la protéine CRM-1 et RanGTP. L'interaction entre CRM-1 et le NES de Rev est nécessaire à l'exportation des ARN

viraux comme mentionné plus haut. L'exportation du complexe Rev/RRE/CRM-1 requiert la collaboration des nucléoporines Nup214, Nup98 et Nup358. Une fois exportée, la conversion de Ran-GTP à RanGDP (guanosine-5'-diphosphate) cause la dissociation de Ran du complexe. Après la dissociation du complexe Rev/RRE/CRM-1 dans le cytoplasme, Rev, RanGDP et CRM-1 retournent au noyau. La protéine Ran revient alors sous la forme GTP pour un cycle subséquent d'exportation (Pollard et Malim, 1998; Hutten et al., 2009).

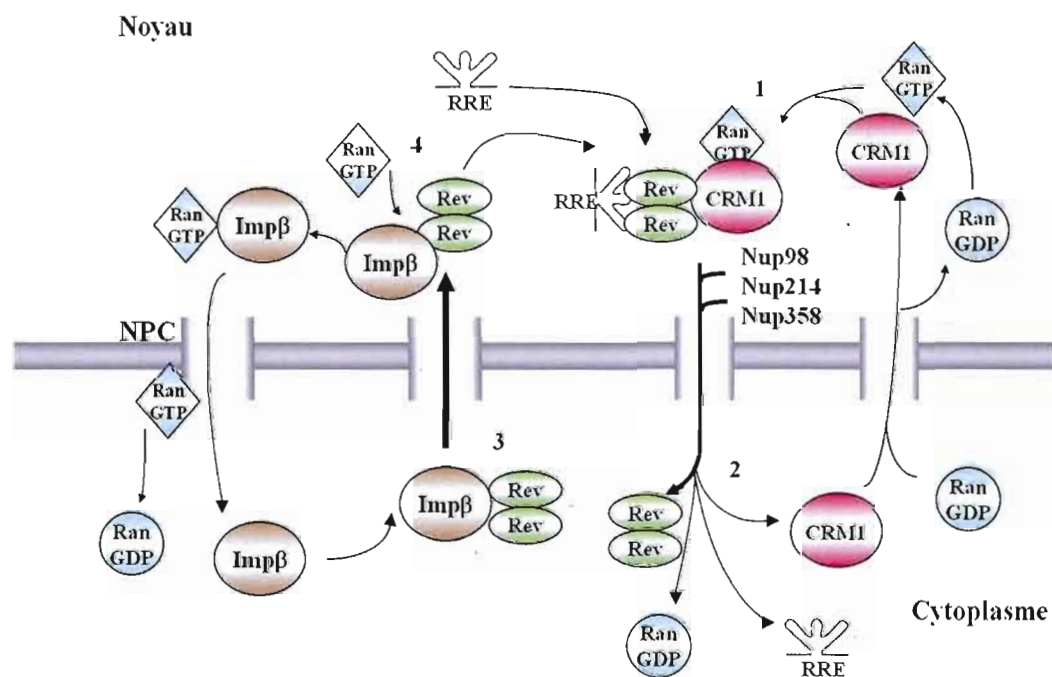


Figure 1.6. Cycle de transport de Rev. Le cycle est séparé en 4 étapes : 1. Formation du complexe CRM-1, Rev, RRE et RanGTP dans le noyau. L'interaction de CRM-1 avec les nucléoporines Nup98, Nup214 et Nup358 est essentielle pour le transport. 2. Une fois dans le cytoplasme, le complexe est dissocié et RanGTP devient RanGDP. CRM-1 et RanGDP sont transportés de nouveau au noyau. 3. Rev forme un complexe avec l'importine β , ce qui permet son importation au noyau. 4. Dans le noyau, l'interaction de RanGTP avec l'importine β induit la libération de Rev. Le complexe importine β -RanGTP traverse le NPC pour commencer un nouveau cycle de transport.

1.3.4 Les nouvelles fonctions de Rev

La protéine Rev du VIH-1 a toujours été reconnue comme une protéine de la phase tardive de l'infection, avec comme fonction principale le transport des ARNs partiellement épissés et non épissés du noyau au cytoplasme. Ce transport a comme objectifs la production des protéines structurales et l'assemblage des nouvelles particules virales (Pollard et Malim, 1998). Cependant, de nouvelles études ont mis en évidence que Rev a d'autres fonctions pendant la phase tardive et qu'elle est également impliquée au cours de la phase initiale de l'infection.

1.3.4.1 Rôles pendant la phase tardive de l'infection

Pendant la phase tardive de l'infection, Rev serait aussi capable d'augmenter considérablement le niveau de traduction, par un effet direct ou indirectement associé à l'augmentation des niveaux d'ARNs viraux dans le cytoplasme (Groom et al., 2009; Groom, Anderson et Lever, 2009; Grewe et Uberla, 2010). Toutefois, le mécanisme exact par lequel Rev élèverait le niveau de traduction n'a pas été bien élucidé jusqu'à maintenant. Cependant, la mise en évidence de l'interaction du complexe Rev-RRE avec au moins 25 protéines cellulaires qui ont normalement un rôle dans la régulation de la traduction appuie fortement le modèle du rôle de Rev comme activateur de la traduction (Groom, Anderson et Lever, 2009). Parmi ces protéines, on retrouve l'eIF5A « *Eukaryotic initiation factor 5A* » initialement connue comme un co-facteur essentiel pour l'initiation de la traduction (Ruhl et al., 1993; Zanelli et Valentini, 2007), la protéine PABP1 « *Poly(A)-binding protein 1* » qui a un rôle dans le recrutement des ribosomes sur la queue polyA des ARNm cellulaires (Kahvejian et al., 2005), la protéine RHA « *RNA helicase A* », qui en outre est capable d'augmenter la traduction des différents ARNs viraux (différents de VIH-1) quoique ces mécanismes d'action ont été récemment révisés (Bolinger et Boris-Lawrie, 2009) et

la protéine Sam68 « *68 kDa Src-associated substrate during mitosis* » qui est impliquée dans le transport nucléo-cytoplasmique, les modifications post-transcriptionnelles et la traduction des ARNs du VIH-1 (Groom, Anderson et Lever, 2009; Suhasini et Reddy, 2009).

Une autre fonction récemment attribuée à Rev est associée à l'encapsidation de l'ARN génomique dans les virions. Rev est capable d'induire une augmentation des niveaux cytoplasmiques d'ARNs viraux non épissés de l'ordre de 3 à 12 fois, mais son effet d'augmentation sur l'encapsidation est de l'ordre de plus de 1 000 fois (Brandt et al., 2007; Blissenbach et al., 2010). Cependant, les mécanismes responsables de cette nouvelle fonction de Rev ne sont pas encore bien éclaircis. Un modèle plausible est que Rev serait capable de moduler les complexes de type RNP formés dans le noyau sur les ARNs qui contiennent le RRE; ainsi Rev guiderait ces complexes vers des compartiments sub-cytoplasmiques spécifiques, ou, comme mécanisme alternatif, Rev affecterait l'accessibilité de l'ARN non épissé du VIH-1 à la traduction et l'encapsidation (Blissenbach et al., 2010).

1.3.4.2 Rôles pendant la phase initiale de l'infection

Rev aurait aussi deux rôles importants pendant la phase initiale de l'infection, soit celle d'inhiber l'intégration du génome viral et de prévenir la réinfection des cellules déjà infectées par le virus (Grewe et Uberla, 2010).

Le rôle possible de Rev dans l'inhibition de l'intégration du génome du VIH-1 est supporté par plusieurs évidences. Rev est capable d'inhiber directement l'activité enzymatique de l'IN virale à travers la formation d'un complexe Rev-IN, permettant ainsi une baisse du nombre d'évènements d'intégration observés chez les cellules infectées par le VIH-1 (Levin et al., 2009a; Levin et al., 2009b). Récemment, il a été

démontré que Rev contrôle le transport nucléo-cytoplasmique de l'intégrase. En effet Rev est capable d'inhiber l'importation nucléaire de l'IN, diminuant de cette façon la probabilité de la translocation des complexes IN-ADN dans l'espace intranucléaire et par conséquent l'interaction avec l'ADN chromosomique cellulaire (Levin et al., 2010b). Rev n'affecte pas seulement le processus d'intégration via l'IN. Rev est aussi capable d'interagir directement avec la protéine LEDGF/75, un co-facteur cellulaire important pour l'intégration de l'ADN génomique du VIH-1 suite à son interaction avec l'IN (Engelman et Cherepanov, 2008). De plus, Rev est capable d'interagir directement avec LEDGF/75, en induisant la dissociation du complexe IN-LEDGF/75 (Grewe et Uberla, 2010). Un modèle a été proposé par lequel Rev lie en même temps à l'IN et la LEDGF/75, bloquant ainsi l'activité de l'IN et empêchant la translocation du complexe de pré-intégration dans l'ADN chromosomique (Grewe et Uberla, 2010).

Des études récentes ont aussi suggéré un rôle possible de Rev dans la prévention de la réinfection des cellules par le VIH-1. La réinfection d'une cellule infectée par des nouveaux virions libérés par cette même cellule affecterait le « fitness » du virus (Levin et al., 2010a). Le premier mécanisme proposé utilisé jusque là pour expliquer comment la cellule infectée était capable d'éviter sa propre auto-infection était la régulation négative par des protéines virales des récepteurs CD4 sur la membrane de la cellule infectée (Wildum et al., 2006). Une étude récente a démontré qu'en absence de Rev, la cellule présenterait une augmentation significative des événements d'intégration et une absence de résistance à la réinfection, suggérant que la protéine Rev est non seulement une protéine accessoire, mais aussi une protéine majeure régulant d'autres aspects de l'infection par le VIH (Levin et al., 2010a).

1.3.5 Protéines Rev différentes de celle du VIH et les protéines « *Rev-Like* »

Des protéines similaires à Rev sont présentes chez d'autres membres des rétrovirus exogènes ainsi que chez les rétrovirus endogènes humains : la protéine Rex du virus de la leucémie des cellules T (HTLV qui appartient au genre *Deltaretrovirus*) (Weichselbraun et al., 1992; Narayan et al., 2003) ; les protéines Rev du EIAV (Lee et al., 2006), du VIF (Kiyomasu et al., 1991; Zou et al., 1997) et du VIS (Malim et al., 1989a) qui appartiennent tous au genre *Lentivirus* ; la protéine Rem du virus « Mouse Mammary Tumor » (MMTV, genre *Betaretrovirus*) (Indik et al., 2005) ; et la protéine Rec du rétrovirus endogène humaine HERV-K (Yang et al., 1999). Bien que toutes ces protéines ne seront pas homologues au niveau de la séquence protéique des domaines riches en arginines et en leucines (voir Figure 1.7), ces protéines Rev et « *Rev-like* » ont une homologie fonctionnelle et structurelle avec la protéine Rev du VIH. Les différentes protéines Rev contiennent dans leur région riche en arginines, les signaux NLS et le domaine de liaison à l'ARN et dans le domaine riche en leucines, le signal NES. Une exception est la protéine Rev du EIAV qui a un domaine bipartite de liaison à l'ARN localisé dans la région centrale et à l'extrémité C-terminale de la protéine (Lee et al., 2006).

| Domaine Riche en Arginines | | Domaine Riche en Leucines | |
|----------------------------|---------------|---------------------------|----------------------------|
| MMTV Rem | AURRKRRREM RK | MMTV Rem | LTLFLALLSVLG |
| HERV-K Rec | PPRRRHNRAP | HERV-K Rec | WAQLKKLTQL |
| HIV-1 Rev | QARRNRRRWR | HIV-1 Rev | PLQLPPLRLTD |
| HTLV-1 Rex | TRAPRRSQRKRP | HTLV-1 Rex | ALSAQYSSSLD |
| EIAV Rev | KRRRK - RRDWR | FIV Rev | KKMMTDLED RFRKLF GSPSKDEYT |
| | | EIAV Rev | PLESDQWCRVLRQSLPEEKIP |

Figure 1.7. Séquences des différents domaines riches en arginines et leucines des protéines Rev ou « *Rev-like* » chez les lentivirus et les rétrovirus, (Pollard et Malim, 1998; Indik et al., 2005).

À la différence des lentivirus complexes, les rétrovirus simples n'ont pas une protéine équivalente à Rev, mais peuvent transporter les ARN non-épissés grâce à une séquence d'ARN nommée élément de transport constitutif (CTE « *constitutive transport element* ») (Hope, 1997). Le CTE se trouve dans les ARN non-épissés sur lesquels se fixent différents facteurs cellulaires qui permettent le transport de ces ARNs au cytoplasme. Le CTE a été initialement découvert chez le « *Mason-Pfizer Monkey Virus* » (M-PMV) (Bray et al., 1994), mais des éléments similaires ont aussi été retrouvés chez d'autres rétrovirus (Zolotukhin et al., 1994; Ogert, Lee et Beemon, 1996; Tabernero et al., 1997). Dans le cas du « *M-MPV* », deux protéines cellulaires, TAP (Gruter et al., 1998) et l'ARN hélicase A (Tang et al., 1997; Li et al., 1999), ont été identifiées et proposées pour avoir un rôle dans l'exportation des ARN-CTE, mais cette voie de transport est différente de la voie utilisée par Rev (Pasquinelli et al., 1997; Saavedra, Felber et Izaurralde, 1997; Kang et Cullen, 1999).

1.4 LE TRANSPORT NUCLÉO-CYTOPLASMIQUE

Les protéines nucléaires comme les histones, les enzymes nécessaires à la réplication et à la transcription des ADNs et ARNs, des protéines impliquées dans la régulation de l'expression des gènes, ainsi que les protéines précurseurs pour la formation des ribosomes sont toutes synthétisées dans le cytoplasme et doivent être transportées au noyau. De la même façon, les ribosomes assemblés dans le noyau, les ARNm et les ARNt doivent être transportés au cytoplasme. La cellule possède un système de transport complexe entre le noyau et le cytoplasme, différent du transport réalisé par un transporteur qui a lieu dans les organelles. Ce système est formé par le complexe du nucléopore et différentes protéines solubles qui serviront de transporteurs. Les transporteurs sont regroupés dans la famille des karyophérines- β qui compte deux types : les importines qui ont pour fonction l'importation au noyau,

et des exportines qui sont liées à l'exportation vers le cytoplasme (Walde et Kehlenbach, 2010; Wentz et Rout, 2010).

1.4.1 Le complexe du nucléopore ou NPC

Le NPC est un transporteur hautement sélectif qui permet le passage d'une grande variété de macromolécules entre le noyau et le cytoplasme. Le NPC, intégré dans l'enveloppe nucléaire, est une structure cylindrique complexe avec une symétrie octogonale et un diamètre de 100-150 nm (Wentz et Rout, 2010). Le NPC chez les vertébrés est constitué d'environ 600 protéines, sa partie centrale étant formée par huit rayons dirigés vers le centre du pore qui forment un réseau. Le NPC est relié au cytoplasme par un anneau cytoplasmique formé par l'enveloppe nucléaire et huit filaments de 35 nm émanant du NPC vers le cytoplasme. Du côté nucléaire, le NPC est aussi relié par un anneau nucléaire et huit filaments de 60 nm sortant dans le noyau. Ces filaments sont reliés entre eux par leur extrémités et forment un anneau en forme de structure en panier (voir Figure 1.8) (Walde et Kehlenbach, 2010). Chez les vertébrés, 30 protéines différentes et nommées nucléoporines (Nups) forment le NPC (Terry et Wentz, 2009). Trois différents types de nucléoporines ont été décrits : les Nups transmembranaires qui servent d'ancrage du NPC à l'enveloppe nucléaire, les FG-Nups, formés par des répétitions de phénylalanine-glycine (FG) localisés principalement dans la partie centrale, et les Nups structurales qui interagissent avec les Nups transmembranaires et les FG-Nups (Walde et Kehlenbach, 2010).

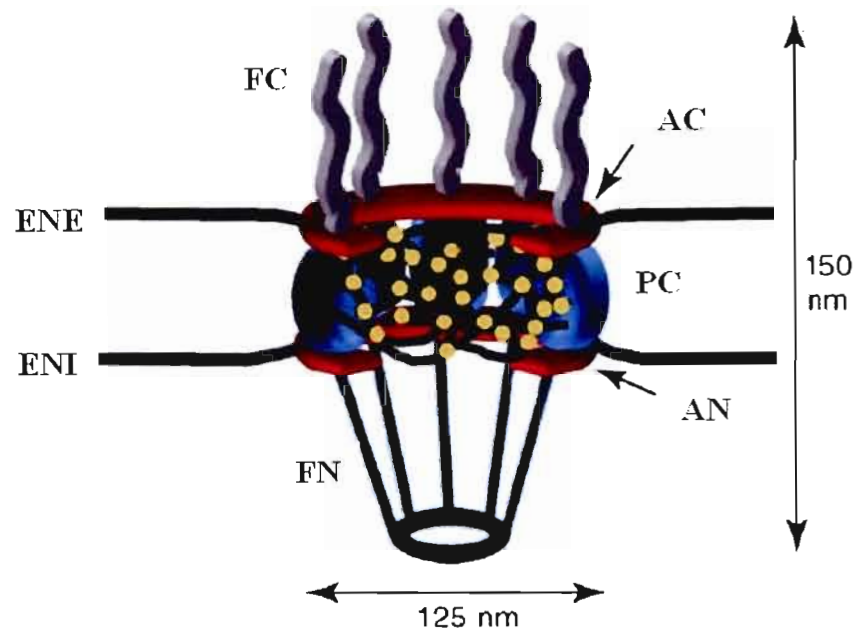


Figure 1.8. Structure du NPC. Le pore central (PC) est représenté par un réseau formé par les FG-Nups, symbolisés par les points jaunes. FC, phénylalanine-glycine ; AC, anneau cytoplasmique ; FC, filaments cytoplasmiques ; AN, anneau nucléaire ; FN, filaments nucléaires ; ENE, enveloppe nucléaire externe ; ENI, enveloppe nucléaire interne. Adapté de (Walde et Kehlenbach, 2010).

La partie centrale du NPC, constituée par le réseau des Nups, a deux rôles clés : elle forme une barrière avec une perméabilité spécifique et elle facilite le transport de macromolécules à travers le NPC (Wente et Rout, 2010). Les macromolécules de plus de 40 kDa ne peuvent pas passer le NPC librement. Par contre, les ions, les petits métabolites et les molécules de moins de 40 kDa traversent librement le NPC (Wente et Rout, 2010). Pour le transport des macromolécules à travers le NPC, la cellule a développé un système dépendant principalement de deux composants, un signal de transport et un récepteur capable de reconnaître le signal (Cook et al., 2007; Stewart, 2007). Les protéines (cargos) qui vont rentrer ou sortir du noyau nécessitent des signaux spécifiques appelés respectivement signaux de localisation nucléaire ou NLS et signaux d'exportation nucléaire ou NES. Les récepteurs capables de reconnaître

ces signaux sont les importines (NLS) et les exportines (NES) (Wente et Rout, 2010). Cependant, les protéines avec un poids moléculaire entre 20 à 40 kDa qui contiennent des NLS et NES sont aussi transportées via le NPC (Gorlich et Mattaj, 1996; He, Weber et Levens, 2000).

1.4.2 La famille des karyophérines β

Comme mentionné ci-dessus, le transport entre le noyau et le cytoplasme de macromolécules de plus de 40 kDa est réalisé grâce à l'aide des importines et exportines qui appartiennent à la famille des karyophérines- β (Kaps β). Chez l'humain, plusieurs Kaps β ont été décrites jusqu'à maintenant (voir Tableau 1.1). Toutes les Kaps β ont des poids moléculaires similaires (90-150 kDa) et une homologie de séquence très faible (10-20%), mais toutes ont des domaines de type HEAT « *Huntingtin, elongation factor 3, PR65/A subunit of protein phosphatase 2A and the TOR lipid kinase* » qui ont une structure en anneau (Cook et al., 2007; Xu, Farmer et Chook, 2010).

TABLEAU 1.1. Famille de karyophérines β ou transporteurs nucléaires

| Famille Kaps β | Nom | Cargo | NLS/NES ^a |
|----------------------|---|-------------------------------|----------------------------------|
| IMB1 | Importine β (Kap β 1) | Protéines- Importine α | NLS classiques et non classiques |
| IMB2 | Kap β 2(Transportine) | Protéines | PY-NLS (M9 séquence) |
| IMB3 | Importine-5(Kap β 3 or RanBP5) | Protéines | Inconnu |
| IMB4 | Importine-4 (RanBP4) | Protéines | Inconnu |
| IMB5 | Importine-9 | Protéines | Inconnu |
| IPO8 | Importine-7 (RanBP7), Importine-8 (RanBP8) | Protéines | Inconnu |
| KA120 | Importine-11 | Protéines | Inconnu |
| TNPO3 | Transportine-SR, Transportine-SR2 (Transportine-3 or TNPO3) | Protéines | Domaines de type RS |
| XPO1 | CRM1 (Exportine-1) | ARNs et Protéines | NES classiques |
| XPO2 | CAS | Importine α | Conformationnelle |

| | | | |
|------|-----------------------|-------------------|--------------------------------|
| XPO4 | Exportine-4 | Protéines | Inconnu |
| XPO5 | Exportine-5 | ARNs et Protéines | Conformationnelle et pre-miARN |
| XPO6 | Exportine-6 | Protéines | Inconnu |
| XPO7 | Exportine-7 (RanBP16) | Protéines | Inconnu |
| XPOT | Exportine-t (Xpo-t) | ARNt | ARNt |

^aNLS: signal de localization nucléaire; NES: signal d'exportation nucléaire.

Chacune des Kaps β reconnaît un ensemble unique de protéines ou d'ARNs, générant ainsi de multiples voies de transport à travers le NPC. Les Kaps β lient aussi les protéines Nups facilitant ainsi le passage du complexe Kap β -protéine à l'intérieur du NPC. L'interaction entre la Kap β et son cargo et le transport de la Kap β vers le cytoplasme sont régulés par l'alternance d'un état GTP ou GDP de la protéine Ran (Cook et al., 2007). RanGTP est présente dans le noyau tandis que RanGDP se trouve au cytoplasme. Pendant l'importation, la Kap β lie son cargo dans le cytoplasme et réalise son transport au noyau; une fois au noyau, RanGTP entre en compétition pour lier la Kap β et de cette façon permet la libération du cargo dans le noyau. La formation du complexe Kap β -RanGTP induit son transport vers le cytoplasme. Une fois au cytoplasme, la protéine RanGTP est hydrolysée en RanGDP, permettant ainsi la libération de la Kap β . Une fois dans le cytoplasme, l'importine sera prête à lier un nouveau cargo et continuer le cycle de transport. Dans le cas de l'exportine, le passage de RanGTP à Ran GDP permet aussi la libération du cargo et de l'exportine dans le cytoplasme. La protéine RanGDP est ensuite transportée au noyau via son propre transporteur, le NTF2 « *nuclear transport factor 2* », où elle sera à nouveau hydrolysée sous la forme RanGTP pour continuer le cycle (voir figure 1.9) (Cook et al., 2007).

Les Kaps β les plus étudiées sont l'importine β (Kap β 1), l'exportine 1 ou CRM1 « *chromosome region maintenance 1 protein* » et la transportine (Kap β 2), Elles permettent le transport d'un grand nombre de cargos via leur interaction avec des

signaux spécifiques (Siomi et al., 1997; Kutay et Guttinger, 2005; Cook et al., 2007). L'importine β reconnaît les NLS, la transportine reconnaît la séquence M9 ou PY-NLS et CRM1 reconnaît les NES (Cook et al., 2007).

1.4.2.1 Les NLS

Les protéines cellulaires qui vont être ciblées vers des organelles comme la mitochondrie, le réticulum endoplasmique ou le noyau contiennent des signaux qui permettent cet adressage spécifique. Les protéines cellulaires destinées au noyau possèdent aussi une séquence d'aa nommée NLS qui permet leur entrée dans le noyau (Cook et al., 2007). Différents types de NLS ont été décrits : les NLS classiques (monopartites et bipartites) et les NLS non classiques.

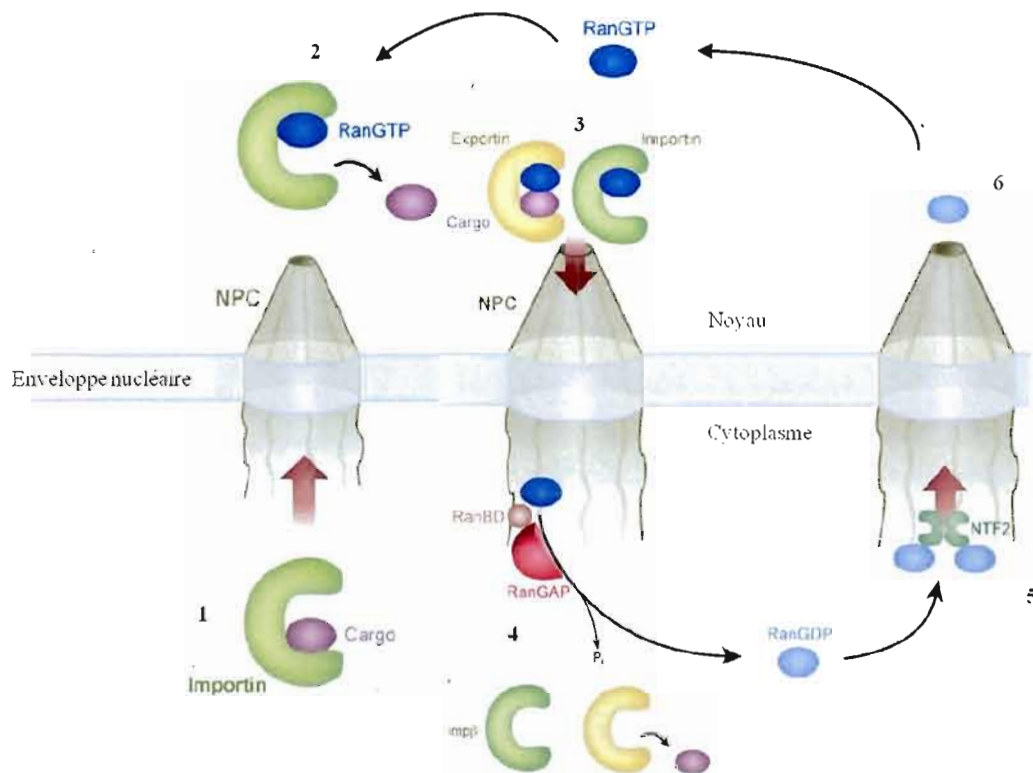


Figure 1.9. Transport nucléo-cytoplasme et le cycle de Ran. 1. L'importine reconnaît la protéine cargo dans le cytoplasme et la transporte via le NPC. 2. Une fois au noyau, la forme RanGTP fait une compétition pour le site de liaison sur la Kap β , libérant ainsi le cargo dans le noyau. 3. Les Kap β , importines ou exportines, font un complexe avec RanGTP pour faciliter son exportation au cytoplasme via le NPC. 4. Une fois au cytoplasme RanGTP devient RanGDP par l'action de RanGAP, permettant ainsi la libération des Kaps β , pour un nouveau cycle d'import ou export. 5. Ran sous sa forme GDP fait un complexe avec la protéine NFT2, qui permet son transport à travers le NPC. 6. Au noyau, RanGDP devient RanGTP et un nouveau cycle commence. Adaptée de (Cook et al., 2007).

Les NLS classiques (NLSc) sont les plus étudiés. Il en existe deux types basés sur la présence d'un ou deux motifs d'aa basiques : les NLSc monopartites (un motif) et les NLSc bipartites (deux motifs). Ces NLSc sont reconnus par l'importine α qui sert de « linker » pour l'interaction entre le cargo et l'importine β (voir ci-dessous). L'exemple classique pour les NLSc monopartites est la séquence NLS de l'antigène large T du virus SV40 ($^{126}\text{P}\mathbf{KKKRRV}^{132}$, les résidus importants étant indiqués en gras). Les NLSc bipartites sont représentés par celui de la nucléoplasmine ($^{155}\mathbf{KRPAATKKAGQAKKKK}^{170}$) (Lange et al., 2007). Les résidus basiques du NLSc de l'antigène T du SV40 ont été nommés P1, P2, P3, P4 et P5. Des études de mutagenèse de différentes positions du NLSc monopartite ont permis d'identifier trois positions clés pour la fonction du NLS: la lysine (K) en position P1, ainsi que deux résidus arginine (R) ou K en positions P2 et P4. Ces études ont permis d'établir une séquence consensus pour les NLSc de type monopartite qui est K(K/R)X(K/R) (Lange et al., 2007). Les NLSc bipartites aussi ont été amplement étudiés et les séquences consensus ont été établies. Il en existe deux types: les NLSc bipartites courts et longs. Cette classification est basée sur la longueur de la séquence qui sépare les deux motifs « spacer », chacun étant composé de deux à trois aa basiques. Les NLSc bipartites courts ont une séquence « spacer » de 8 à 10 résidus (R/K_{2-3} , 8-10 aa R/K_{2-3}) et les longs, de 30 à 32 résidus (R/K_{2-3} , 30-32 aa R/K_{2-3}) (Lange et al., 2007; Kosugi et al., 2009).

Il existe aussi des NLS non classiques (NLSnc) que ne contiennent pas des séquences consensus comme celles décrites auparavant et qui peuvent interagir directement avec l'importine β ou la transportine sans l'aide de l'adaptateur importine α (Cingolani et al., 2002). Des protéines comme l'importine α et la snuportine 1 possèdent un domaine IBB pour « *importin β binding* » qui contient un ARM et sert de NLS, permettant ainsi son interaction avec l'importine β (Cook et al., 2007). D'autres protéines comme SREBP-2 « *sterol regulatory element-binding protein2* » ou PTHrP « *parathyroid hormone related protein* » ne contiennent pas d'IBB mais sont capables d'interagir et d'être transportées directement par l'importine β (Lee et al., 2003; Cook et al., 2007). Finalement, les protéines virales comme Rev et Tat du VIH-1 ont des NLSnc de type ARM qui interagissent directement avec l'importine β (Truant et Cullen, 1999).

La transportine (Kap $\beta 2$) est aussi capable de lier ses cargos via un type de NLSnc nommé PY-NLS. Au moins 20 protéines qui lient l'ARN « *RNA binding proteins* » ont été identifiées comme cargos de la transportine (Chook et Suel, 2010). hnRNAP « *heterogeneous nuclear ribonucleoprotein* » a été la première protéine identifiée contenant ce nouveau type de PY-NLS. La séquence de ce PY-NLS est formée de 38 aa et a été nommée initialement M9 (Siomi et al., 1997). Suivant cette recherche, l'étude de plusieurs protéines qui contenaient une séquence similaire à M9 a conduit à deux séquences consensus établies, le hPY-NLS et le bPY-NLS. La première a une extrémité N-terminale hydrophobe (h) et la deuxième a une extrémité N-terminale de type basique (b) (Chook et Suel, 2010).

1.4.2.2 Les NES

La sortie des protéines du noyau vers le cytoplasme au travers du NPC est réalisée par l'intermédiaire d'un NES. Le NES est reconnu par un transporteur spécifique, l'exportine, qui va transporter la protéine du noyau vers le cytoplasme à travers le

NPC (Stewart, 2007). Les NES sont des séquences d'aa courts qui contiennent 4 résidus hydrophobes (ϕ_1 – ϕ_4). La protéine Rev du VIH-1 et l'inhibiteur de la protéine kinase A (PKI « *protein kinase inhibitor* ») ont été les premières protéines pour lesquelles une séquence NES a été décrite (Wen et al., 1995). Grâce à elles, deux types de NES consensus ont été établis, le type Rev VIH-1-NES et le type PKI-NES. Le NES de Rev VIH-1 est composé des résidus **LPPLERLTL** (les résidus hydrophobes sont indiqués en gras) avec la séquence consensus $\phi_1xx\phi_2xx\phi_3x\phi_4$ et le PKI-NES est composé de **LALKLAGLDI** avec une séquence consensus $\phi_1xxx\phi_2xx\phi_3x\phi_4$. Le x est un aa préférentiellement chargé, de type polaire et petit (Guttler et al., 2010). À date, plus de 75 protéines cellulaires et virales ont été identifiées comme contenant soit des séquences Rev VIH-1-NES soit des PKI-NES qui sont essentiellement formées par des résidus de type leucine. Des études de séquences NES d'autres protéines a permis d'inclure d'autres résidus hydrophobes comme l'isoleucine, la valine, la méthionine et la phénylalanine à la place de la leucine (Guttler et al., 2010).

1.4.3 L'importation au noyau

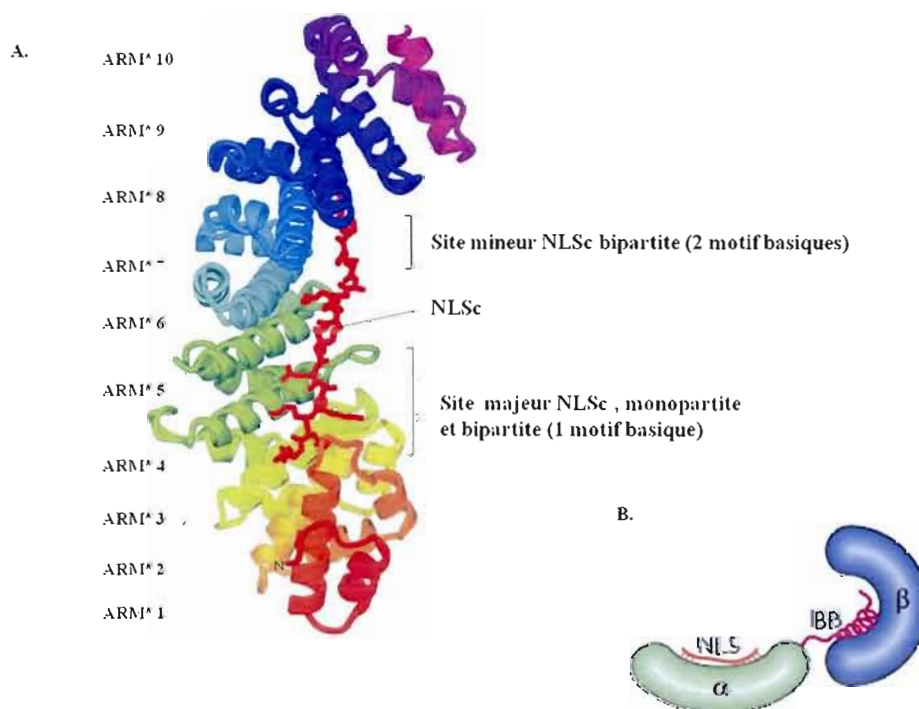
Trois principales voies d'importation ont été décrites, en fonction de l'utilisation des karyopherines- β : la voie classique d'importation, la voie d'importation directe via l'importine β et la voie d'importation directe via la transportine (Cook et al., 2007; Stewart, 2007).

1.4.2.1 La voie classique d'importation

La voie classique d'importation a été la première décrite et deux types d'importines, les importines α et β sont impliqués. Dans cette voie, l'importine α sert de protéine adaptatrice qui est capable de reconnaître les NLSc des protéines cargo, résultant en la formation d'un complexe cargo-importine α . Une fois ce complexe formé, l'importine β va reconnaître un NLS dans l'importine α et le complexe cargo-

importine α -importine β est transporté au noyau via le NPC (Cook et al., 2007; Stewart, 2007).

L'importine α contient un domaine nécessaire à l'interaction avec les NLSc. Ce domaine est formé par une série de 10 répétitions en tandem de type Armadillo (ARM*), ce qui lui donne la forme d'une banane (Stewart, 2007). Les ARM* qui interagissent avec les NLSc sont formés par une séquence de résidus de type asparagine et/ou tryptophane, ainsi que d'autres résidus de type acide (Stewart, 2007). Deux sites d'interaction pour des NLSc sont présents dans l'importine α , le site majeur, formé par les ARM* 1 à 4, et le site mineur formé par les ARM* 6 à 8 (voir Figure 1.10) (Stewart, 2007). Les NLSc monopartites interagissent avec le site majeur tandis que les NLSc bipartites le font avec le site mineur pour le premier motif et avec le site majeur pour le deuxième motif du NLSc (Stewart, 2007).



Les NLSc vont spécifiquement interagir avec deux régions : le site majeur formé par les ARM* 1 à 4 et le site mineur formé par les ARM* 6 à 8. B. Le complexe NLS-importine α -importine β . Adaptée de (Cook et al., 2007).

La partie N-terminale de l'importine α contient un domaine IBB qui permet l'interaction avec l'importine β . Le domaine IBB possède un NLSnc de type ARM qui lie directement les hélices β des répétitions HEAT 7 à 19 de l'importine β . Ainsi, le complexe NLSc-importine α -importine β est formé et prêt pour traverser le NPC (voir Figure 1.9B) (Stewart, 2007). Une fois au noyau, la liaison de RanGTP avec l'importine β permet la dissociation du complexe NLSc-importine α -importine β en NLSc-importine α et importine β libre. La protéine cargo qui contient le NLSc doit être ensuite libérée de son complexe avec l'importine α . Pour ce faire, la Nup 2 entre en compétition avec le NLSc pour lier le domaine IBB, facilitant ainsi la libération de la protéine cargo et laissant libre l'importine α dans le noyau (Stewart, 2007). Une fois le complexe NLSc-importine α -importine β totalement défait, les importines α et β doivent être exportées au cytoplasme pour permettre un nouveau cycle d'importation (voir Figure 1.11) (Stewart, 2007).

Noyau

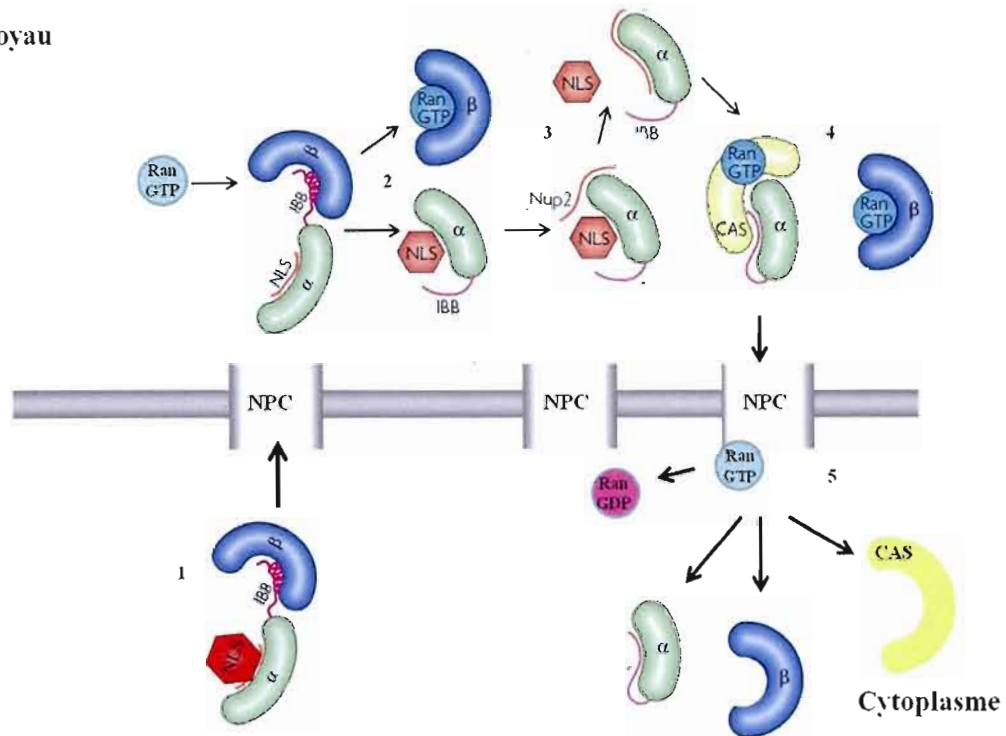


Figure 1.11. Voie classique d'importation au noyau. 1. Formation du complexe NLS-importine α -importine β au cytoplasme et transport à travers le NPC. 2. Une fois au noyau la protéine RanGTP induit le désassemblage de l'importine β du complexe, ce qui résulte en la formation du complexe RantGTP-importine β . 3. L'interaction de la Nup 2 avec l'importine α permet la libération de la protéine cargo qui contient le NLS dans le noyau. 4. L'exportine CAS forme un complexe avec l'importine α à l'aide de RanGTP ; de la même façon, l'importine β complexe avec RanGTP pour permettre l'exportation via le NPC. 5. Une fois au cytoplasme, le passage de la forme RanGTP à RanGDP induit la libération de l'importine β ou de CAS. Adapté de (Stewart, 2007).

Comme mentionné ci-dessus, l'importine β forme un complexe avec RanGTP et traverse le NPC tandis que l'importine α est exportée activement par son transporteur, l'exportine CAS « *cellular apoptosis susceptibility* » (Kutay et al., 1997). La protéine CAS est structurellement similaire à l'importine β et lie aussi le domaine IBB de l'importine α . Des mutations au niveau de l'IBB affectent non seulement l'interaction avec le NLS mais aussi l'exportation de l'importine α via CAS (Stewart, 2007).

L'exportine CAS forme un complexe avec l'importine α et RanGTP qui est exporté via le NPC (voir Figure 1.10) (Stewart, 2007).

1.4.2.2 La voie d'importation directe par l'importine β

La voie d'importation directe via l'importine β a été décrite pour différentes protéines comme la SREBP-2, PTHrP et des protéines virales comme Rev et Tat du VIH-1 (Palmeri et Malim, 1999; Stewart, 2007). Dans le cas des protéines Rev et Tat du VIH-1, l'importine β est capable d'interagir directement avec le NLSnc de type ARM de ces protéines, sans l'intermédiaire de l'importine α , et transporte les protéines au noyau (Palmeri et Malim, 1999). Cette voie a déjà été décrite dans la section du transport de la protéine Rev du VIH-1. La protéine SREBP-2 ne contient pas d'ARM, mais l'interaction avec l'importine β se fait via son domaine HLHZ « *helix-loop-helix-leucine-zipper* » qui interagit avec les répétitions de type HEAT 7 à 17 de l'importine β (Lee et al., 2003). PTHrP ne se lie pas à l'importine β comme une molécule pliée (au contraire de SREBP-2 et du domaine IBB de l'importine α). PTHrP contient un signal d'importation linéaire et le mécanisme d'interaction avec l'importine β se fait probablement de la même façon que celle de l'importine α et les NLSc (Lam et al., 1999; Cook et al., 2007).

1.4.2.3 La voie d'importation via la transportine

Un autre mécanisme d'importation a été décrit soit celui via la transportine. Cette protéine est capable de reconnaître un PY-NLS dans les protéines cargo (voir ci-haut) (Chook et Suel, 2010). La transportine importe ses protéines au noyau via le NPC et libère son cargo au noyau via l'interaction avec la RanGTP, de façon similaire à celle utilisée par l'importine β (Chook et Suel, 2010).

1.4.4 L'exportation du noyau des protéines et des ARN au cytoplasme

Les Kaps β contrôlent également l'exportation des protéines et d'ARN à partir du noyau vers le cytoplasme. La cellule a mis en place différentes voies d'exportation dépendant du cargo et de la Kaps β ou de l'exportine impliquée. Parmi les voies connues jusqu'à maintenant se retrouve la voie via l'exportine CAS, la voie de l'exportine Xpot et Xpo5 et la voie via l'exportine CRM 1 (Cook et Conti, 2010). La voie d'exportation via CAS a déjà été décrite dans la section de la voie classique d'importation au noyau. Les exportines Xpot et Xpo5 permettent le transport vers le cytoplasme des petits ARNs comme les ARNt et les pré-micro ARNs. L'interaction entre Xpot et Xpo5 et ses ARNs cargos ne dépendent pas d'une séquence d'ARN spécifique mais d'une forme et d'une charge de l'ARN qui est complémentaire à l'exportine (Cook et Conti, 2010). L'exportine 1 ou CRM1 est la principale exportine cellulaire et facilite l'exportation des cargos qui ont un signal de type NES (décrit ci-dessus) (Kutay et Guttinger, 2005). La protéine RanGTP contrôle la formation et le désassemblage de complexes CRM1-NES, formant ainsi un complexe RanGTP-CRM1-NES qui est transporté vers le cytoplasme via le NPC. Une fois dans le cytoplasme, le complexe se dissocie par un mécanisme qui implique la protéine RanBP1 ou Nup358 localisée dans les filaments cytoplasmiques du NPC et l'hydrolyse de RanGTP en RanGDP par la protéine Ran Gap (voir Figure 1.6 et 1.9) (Koyama et Matsuura, 2010).

CHAPITRE II

THE BOVINE IMMUNODEFICIENCY VIRUS REV PROTEIN: IDENTIFICATION OF A NOVEL LENTIVIRAL BIPARTITE NUCLEAR LOCALIZATION SIGNAL HARBORING AN ATYPICAL SPACER SEQUENCE

Andrea Gomez Corredor et Denis Archambault

Département des Sciences Biologiques,
Université du Québec à Montréal, Québec, Canada

Ce chapitre présenté sous forme d'un article scientifique a été publié dans la revue « *Journal of Virology* », le 1 octobre 2009. La conception et la réalisation des expériences ont été faites par l'auteur de cette thèse (Andrea Gomez Corredor). La rédaction du manuscrit ainsi que le montage des figures ont été réalisées par l'auteur de cette thèse. Le professeur Denis Archambault a contribué de manière importante à la réalisation de cette étude en apportant son expertise scientifique avisée et ses commentaires judicieux, ainsi que le support financier. Pour des raisons écologiques et d'économie de papier, les références de cet article se retrouvent à la fin du manuscrit.

2.1 ABSTRACT

The bovine immunodeficiency virus (BIV) Rev protein (186 amino acids [aa] in length) is involved in the nuclear exportation of partially spliced and unspliced viral RNAs. Previous studies have shown that BIV Rev localizes in the nucleus and nucleolus of infected cells. Here we report the characterization of the nuclear/nucleolar localization signals (NLS/NoLS) of this protein. Through transfection of a series of deletion mutants of BIV Rev fused to enhanced green fluorescent protein and fluorescence microscopy analyses, we were able to map the NLS region between aa 71 and 110 of the protein. Remarkably, by conducting alanine substitution of basic residues within the aa 71 to 110 sequence, we demonstrated that the BIV Rev NLS is bipartite, maps to aa 71 to 74 and 95 to 101, and is predominantly composed of arginine residues. This is the first report of a bipartite Rev (or “*Rev-like* ») NLS in a lentivirus/retrovirus. Moreover, this NLS is atypical, as the length of the sequence between the motifs composing the bipartite NLS, e.g., the spacer sequence, is 20 aa. Further mutagenesis experiments also identified the NoLS region of BIV Rev. It localizes mainly within the NLS spacer sequence. In addition, the BIV Rev NoLS sequence differs from the consensus sequence reported for other viral and cellular nucleolar proteins. In summary, we conclude that the nucleolar and nuclear localizations of BIV Rev are mediated via novel NLS and NoLS motifs.

2.2 INTRODUCTION

Bovine immunodeficiency virus (BIV) is a lentivirus of the *Retroviridae* family which shares morphological, genetic, antigenic, and/or biologic properties with human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) and other animal lentiviruses including equine infectious anemia virus (EIAV) (Gonda et al., 1987; Gonda et al., 1994; St-Louis, Cojocariu et Archambault, 2004). Although the association of clinical diseases with BIV is still controversial, persistent lymphocytosis, neurological disorders associated with central nervous system lesions, weight loss, diminished milk production, lymphoid hyperplasia, and the presence of opportunistic bacterial infections have been associated with BIV infection (Van der Maaten, Malmquist et Cheville, 1972; Martin et al., 1991; Carpenter et al., 1992; Onuma et al., 1992). Interestingly, studies of rabbits experimentally infected with BIV have shown the development of a disease characterized by a fatal dysfunction of the immune system similar to that observed in humans, nonhuman primates, and cats infected with HIV-1 (or HIV-2), simian immunodeficiency virus, and feline immunodeficiency virus, respectively (Kalvatchev et al., 1995; Kalvatchev et al., 1998).

BIV is categorized as a complex non primate lentivirus (St-Louis, Cojocariu and Archambault, 2004). The BIV provirus DNA is 8,960 nucleotides in length with a typical retroviral genomic structure containing the *gag*, *pol*, and *env* genes flanked by long terminal repeats of 589 nucleotides in length at the 5' and 3' termini (Gonda et al., 1994; St-Louis, Cojocariu and Archambault, 2004). In proximity to the *pol/env* junction, the BIV genome also contains additional open reading frames that may encode nonstructural regulatory/accessory proteins (Gonda et al., 1994; St-Louis, Cojocariu and Archambault, 2004). These open reading frames are designated *vif* (viral infectivity factor), *tat* (*trans*-activator factor of transcription), *rev* (regulator of virus expression), *vpw*, *vpy*, and *tmx*. Only the Tat and Rev proteins have been

reported to regulate viral expression at the transcriptional and posttranscriptional levels, respectively (Gonda et al., 1987; Garvey et al., 1990; Gonda et al., 1994; St-Louis, Cojocariu et Archambault, 2004). Among the latter proteins, only the Tat protein and its transactivator response element (TAR) located within the long terminal repeat sequence have been intensively studied (Pallansch, Lackman-Smith and Gonda, 1992; Chen and Frankel, 1994; Puglisi et al., 1995; Fong et al., 1997; Barboric et al., 2000; Deng et al., 2008; Xuan et al., 2008).

BIV Rev is a 23-kDa (186-aa-long) phosphoprotein produced from a multiply spliced mRNA that contains the untranslated leader (exon 1) and two encoding exons (exons 2 and 3) (Oberste, Greenwood et Gonda, 1991). It has been shown that BIV Rev localizes to the nucleus and nucleoli of BIV-infected cells (Oberste et al., 1993). As reported for HIV-1 Rev, BIV Rev mediates the nuclear exportation of partially spliced viral RNAs encoding structural proteins and of unspliced RNAs that serve as genomic RNA by interacting with a stem-loop structure termed Rev-responsive element (RRE) present in these RNAs (Pollard and Malim, 1998). The Rev proteins contain at least three central functional domains: a basic arginine-rich domain that mediates RNA binding (RBD) and contains the nuclear/nucleolar localization signal (NLS/NoLS), a multimerization domain, and a leucine-rich domain that is necessary for the nuclear exportation of Rev (Pollard et Malim, 1998; Narayan et al., 2003).

In HIV-1, the Rev protein shuttles between the nucleus and the cytoplasm of the infected cells via the importin/exportin proteins or nucleoporin pathway (Pollard et Malim, 1998). The shuttling of HIV-1 Rev into the nucleus is mediated by the direct binding of Rev NLS to the nuclear transport receptors, mainly importin β but also transportin, importin 5, and importin 7 (Arnold et al., 2006). This mechanism differs from the classical protein importation α/β pathway where importin α serves as an adaptor that links the protein and importin β 1 and recognizes NLSs within the proteins. Importin α recognizes two types of NLSs: the classical monopartite NLSs

and the bipartite NLSs that are composed, respectively, of one or two clusters of basic amino acids (predominantly lysine residues (Lange et al., 2007). Monopartite NLSs are currently categorized in five different classes on the basis of amino acid composition and of their interaction with importin α (Kosugi et al., 2009). One well-known example of class 1 monopartite NLS is that of the SV40 large T antigen (PKKKRRV) (Kalderon et al., 1984; Kosugi et al., 2009). Bipartite NLSs are less diversified, as they are classified into two main types (long and short) according to the length of the so-called spacer region, which refers to the number of amino acids between the motifs that compose the NLS (Romanelli et Morandi, 2002). An example of a bipartite NLS is the short-type NLS of the nucleoplasmin protein with a spacer region of 10 aa (Robbins et al., 1991). The long-type bipartite NLS with a spacer of 30 aa is exemplified by the HnRNP1 protein (Romanelli et Morandi, 2002).

The NLS motifs of numerous Rev or Rev-like proteins have been characterized so far including those of Rev HIV-1, feline immunodeficiency virus, simian immunodeficiency virus, and EIAV and of Rev-like family members such as the mouse mammary tumor virus Rem, the endogenous retrovirus human endogenous retrovirus K Rec, and the human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) Rex (Malim et al., 1989a; Kiyomasu et al., 1991; Pollard et Malim, 1998; Yang et al., 1999; Narayan et al., 2003; Indik et al., 2005; Lee et al., 2006). These NLSs are all monopartite structures, and based on their amino acid composition, they are nonclassical because they contain clusters of basic amino acids, mainly arginine residues (Hope et al., 1990a; Magin et al., 2000; Lee et al., 2006). Moreover, importin α , as mentioned above, is not involved in the recognition of HIV-1 Rev NLS (Neville et al., 1997; Truant et Cullen, 1999; Arnold et al., 2006). In addition to the NLS, HIV-1 and certain Rev-like proteins contain a NoLS that mediates the accumulation of Rev in nucleoli (Kubota et al., 1989; Cochrane, Perkins et Rosen, 1990). These NoLSs correspond to one or multiple copies of the R/K-R/K-X-R/K consensus sequence (Emmott et Hiscox, 2009).

Little is known on the exact location and amino acid composition of the BIV Rev functional domains. This is undoubtedly of interest as the BIV Rev amino acid sequence does not display a high degree of homology with that of other lentiviral Rev proteins. Here, we have determined the localization of the NLS and NoLS regions of BIV Rev. By generating a series of deletion and single point mutants, we have mapped a bipartite NLS in a Rev protein for the first time in a lentivirus. We found that BIV Rev NLS is atypical, as it harbors a 20-aa spacer sequence between the motifs that compose the NLS. We also identified the BIV Rev NoLS, which also differs from the NoLSs previously described in any viral or cellular proteins in terms of amino acid composition and/or its location in the spacer region of the bipartite NLS.

2.3 MATERIALS AND METHODS

2.3.1 Cell cultures and transfections

HEK 293T, Cf2Th, MDBK, and Vero cells were maintained at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ in Dulbecco's modified Eagle's medium (Invitrogen, Carlsbad, CA) supplemented with 10% fetal bovine serum (PAA Laboratories, Inc., Etobicoke, Ontario, Canada). Cell transfections were done in six-well cell culture plates seeded to a cell density of ~50% confluence. The next day, plasmids were mixed with the FuGENE HD transfection reagent (Roche, Indianapolis, IN) and added to the cells according to the manufacturer's protocol.

2.3.2 Construction of Rev deletion mutants

Rev mutants (M1 to M9) containing internal deletions were generated by PCR-ligation-PCR mutagenesis (Ali et Steinkasserer, 1995). Briefly, upstream and downstream blunt-ended cDNA fragments of each mutant were amplified from pcDNA3.1BIVRevWT (wild type [WT]) with appropriate phosphorylated primers

(sequences available upon request). Fragments were gel purified and ligated to the corresponding upstream fragment. Ligation products were then amplified by using the forward Rev5' (5'-ATGGATCAGGACCTAGACCGCGC-3') and reverse Rev3' (5'-TTTTGTTCCCTGGATCCATCC-3') primers. The generated PCR products were cloned into pBluescript KS(+) (Stratagene, La Jolla, CA). The N-terminal (M1) and the C-terminal (M9) mutants were PCR amplified using a forward primer (containing an ATG initiation codon) and a reverse primer (containing a stop codon), respectively. All constructs were confirmed by DNA sequencing through the McGill University Sequencing Services (Montréal, Québec, Canada).

2.3.3 Rev fusion proteins

To generate proteins containing c-Myc and six-histidine tags fused to the C terminus of Rev, BIV Rev WT and the deletion mutants were amplified by PCR from the pBluescript KS(+) constructs described above with primers that introduced 5' NotI and 3' ApaI restriction sites. Digested PCR products were cloned into the pcDNA3.1Myc/HisB expression vector (Invitrogen) and sequenced for validation. To generate enhanced green fluorescent protein (EGFP) fusion proteins, the Rev sequences were amplified by PCR from the WT and deletion constructs with primers that introduced 5' XhoI and 3' ApaI restriction sites. The PCR products were digested with XhoI and ApaI and subsequently cloned into the corresponding restriction sites in the pEGFP-C1 vector (Clontech, Palo Alto, CA) to generate pEGFP-BIVRevWT and pEGFP-BIVRev mutant constructs. To generate the EGFP-NLS BIV, the region containing the putative NLS of BIV (aa 71 to 110) of Rev WT was amplified by PCR and cloned in pEGFP-C1 as described above.

The Rev Δ constructs targeting selected regions of the BIV Rev WT were generated as described for the Rev deletion mutants by using appropriate phosphorylated primers (sequences available upon request). The resulting PCR

products were directly cloned into pEGFP-C1. The Rev delta (Δ) constructs were as follow: Rev Δ 1 (deletion of ⁷¹RARK⁷⁴ residues), Rev Δ 2 (deletion of ⁷⁹RR⁸⁰ residues), Rev Δ 3 (deletion of ⁹⁵RRKQERR¹⁰¹ residues), and Rev Δ 4 (deletion of ¹⁰⁷RR¹⁰⁸ residues) (see Figure 2.4A). Alanine substitution mutants were generated by site-directed mutagenesis using appropriate primers and were introduced into the EGFP-Rev protein (Table 2.1). All constructs were validated by DNA sequencing.

TABLE 2.1. Listing of the BIV Rev mutant proteins^a

| Mutant | Mutation at residue: | | | | | | | | | | | | | | |
|--------|----------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| | ⁷¹ R | ⁷³ R | ⁷⁴ K | ⁷⁹ R | ⁸⁰ R | ⁸³ K | ⁸⁸ R | ⁹⁵ R | ⁹⁶ R | ⁹⁷ K | ⁹⁸ R | ¹⁰¹ R | ¹⁰² R | ¹⁰⁸ R | ¹⁰⁹ K |
| Mut 1 | A | | | | | | | | | | | | | | |
| Mut 2 | | A | A | | | | | | | | | | | | |
| Mut 3 | | | | A | A | | | | | | | | | | |
| Mut 4 | | | | | | A | | | | | | | | | |
| Mut 5 | | | | | | | A | | | | | | | | |
| Mut 6 | | | | | | | | A | A | A | | | | | |
| Mut 7 | | | | | | | | A | | | | | | | |
| Mut 8 | | | | | | | | | A | | | | | | |
| Mut 9 | | | | | | | | | | A | | | | | |
| Mut 10 | | | | | | | | | | | A | A | | | |
| Mut 11 | | | | | | | | | | | | A | A | | |
| Mut 12 | | | | | | | | | | | | | | A | |
| Mut 13 | | | | | | | | | | | | | | | A |
| Mut 14 | | | | | | | | | | | | | | | A |
| Mut 15 | A | A | A | | | | | | | | | | | | |
| Mut 16 | | | | | | | | A | A | A | A | A | | | |
| Mut 17 | | | | | | A | A | | | | | | | | |
| Mut 18 | | | | | | | | | A | A | A | A | A | | |
| Mut 19 | | | | | | | | | | A | A | A | A | | |
| Mut 20 | A | A | A | | | | | | | | A | A | | | |
| Mut 21 | | | | | | | | | | | | | | | |
| Mut 22 | | | | A | A | | | A | A | A | A | A | | | |
| Mut 23 | A | A | A | | | A | A | | | | | | | | |
| Mut 24 | A | A | A | | | | | A | A | A | A | A | | | |
| Mut 25 | | | | A | A | | A | | | | | | | | |
| Mut 26 | | | | A | A | | A | A | | | | | | | |

^aThe indicated arginine (R) and lysine (K) residues in the BIV Rev sequence were changed to alanine (A) residues.

2.3.4 Red fluorescence fusion proteins

To generate the red fluorescent protein (RFP) in fusion with other proteins, the sequence of RFP cDNA was amplified by PCR from pDSRED2-N1 (Clontech) by using primers that introduced 5' NheI and 3' XhoI restriction sites. To clone the RFP, the pEGFP-C1 vector (Clontech) was digested with NheI and XhoI to replace the EGFP sequence with RFP. The resulting plasmid was designated pRED-C1. To generate the nucleolin, fibrillarin, and B23.1 versions of pRED-C1, the corresponding cDNAs were obtained by using KpnI and BamHI restriction enzymes from plasmids

pEGFP-C1Nucleolin, pEGFP-C1Fibrillarin, and pEGFP-C1B23.1 (Emmott et al., 2008) that were kindly provided by Dr. Julian A. Hiscox (University of Leeds, Leeds, UK). The nucleolin, fibrillarin, and B23.1 fragments were then subcloned into pRED-C1 previously digested with KpnI and BamHI restriction enzymes. All constructs were validated by DNA sequencing.

2.3.5 Indirect immunofluorescence assay

Cells cultured on coverslips in six-well cell culture plates were transfected with the respective expression vectors. After an incubation of 48 h, the transfected cells were fixed with 4% paraformaldehyde in phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.3) solution for 15 min, permeabilized with 0.2% Triton X-100 for 10 min, blocked with 4% bovine serum albumin in PBS for 1 h at 37°C, and then incubated with mouse primary anti-Myc antibodies (1 µg/ml; Roche) for 1 h at 37°C. After three washes with PBS containing 0.2% Triton X-100, the cells were incubated with Alexa 488- or Cy3-labeled anti-mouse secondary antibodies (Invitrogen) for 1 h at 37°C. Nuclei were counterstained with DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). The coverslips were then mounted on glass slides using ProLong Gold antifade reagent (Invitrogen). The fluorescence images were taken with an Eclipse Ti fluorescent microscope (Nikon) equipped with a 60x 0.75-numerical-aperture objective lens. Images were captured as 8-bit tagged image file format files with a Scion CFW-1608C camera. All images were analyzed with the Image-J software (Rasband, 1997-2004a). For each protein examined, 50 positive cells were observed. The data shown below were representative, from three independent experiments, of expression patterns observed in > 70% of the cells.

2.3.6 Fluorescence and confocal microscopy

Cells cultured on coverslips in six-well cell culture plates were transfected with each of the respective pEGFP and pRed expression constructs. After 24 h of

incubation, for certain samples, 5 nM of leptomycin B (LMB; Sigma-Aldrich) was added to the cell culture medium for 4 h. The cells were fixed for nuclear staining and mounted as described above. The fluorescence images were captured as described above. For confocal microscopy analysis, the cells were cultured on glass chamber slides (Thermo Fisher, Ottawa, Ontario, Canada). Unfixed cells were examined 24 h after transfection. The images were taken using an inverse microscope (Nikon TE-300) coupled to the confocal Bio-Rad MRC-1024ES system. All images were analyzed with the Image-J software. For each protein examined, 50 expressing cells were observed. The data shown below were representative, from three independent experiments, of expression patterns observed in >70% of cells.

2.3.7 Chloramphenicol acetyltransferase (CAT) assay

Rev nuclear export activity was quantified in transient-transfection assays using a pDM138-based BIV Rev chloramphenicol acetyltransferase (CAT) reporter construct. The minimal region of BIV RRE (Molina et al., 2002) was cloned into the *clal* site of plasmid pDM138 (Huang et al., 1991) (a generous gift of Yuying Liang from Emory University) to generate pRRE-BIV, the sequence of which was validated by sequencing. 293T cells were seeded in 12-well cell culture plates and then cotransfected the next day with 0.5 µg of empty pcDNA3.1 Myc/HisB or pEGFP-C1 or each of the pcDNA3.1 Myc/HisB or pEGFP constructs encoding either Rev WT or each of the Rev mutants, 0.5 µg of pRRE-BIV, and 0.2 µg of Rous sarcoma virus β-galactosidase plasmid (Fisher Scientific, Nepean, Ontario, Canada). The Rous sarcoma virus β-galactosidase plasmid was used as a control for transfection efficiency and normalization of data. Cells were harvested at 48 h following transfection and lysed with the lysis buffer (CAT enzyme-linked immunosorbent assay kit; Roche). The amount of CAT in 50 µg of total cellular proteins was determined using the CAT enzyme-linked immunosorbent assay kit. β-Galactosidase activity of each cell extract was determined by incubating 50 µg of proteins with 50

μ l of β -galactosidase assay buffer (100 mM sodium phosphate buffer, pH 7.3, 2 mM MgCl_2 , 10 mM β -mercaptoethanol, and 133 mg/ml *o*-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside) for 30 min at 37°C. The reaction was stopped by the addition of 150 μ l of 1 M sodium carbonate. Colorimetric reaction was measured at 410 nm in a microplate reader (model 550; Bio-Rad). CAT expression data were normalized through the establishment of a ratio using β -galactosidase activity for each sample. Rev activity was defined as the ratio of CAT quantity obtained in cells transfected with the plasmids containing BIV RRE and Rev WT- or Rev mutant-encoding sequences to that obtained in cells transfected with the BIV RRE-containing plasmid alone. All cell transfections were performed in triplicate, and the experiments were repeated three times. Statistical analysis was performed using a two-tailed *t* test.

2.3.8 SDS-PAGE and Western blot analyses

Cell extracts were prepared as described previously (St-Louis, Abed et Archambault, 2005). Total cell protein concentrations were quantified with the DC protein assay (Bio-Rad). For each sample, 50 μ g of total cell extract was electrophoretically separated onto 12 or 15% sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide gels and transferred to nitrocellulose membranes. The membranes were blocked in PBS-T (PBS containing 0.05% Tween 20) in the presence of 5% nonfat dry milk powder for 1 h at room temperature. The membranes were incubated for 1 h at room temperature with mouse monoclonal primary antibodies specific to either GFP (Roche), Myc (Roche), or glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (Sigma-Aldrich). Following incubation with the antibodies, membranes were washed three times with PBS-T and incubated for 1 h (at room temperature) with anti-mouse horseradish peroxidase-conjugated immunoglobulin Gs (Bethyl, Montgomery, TX) used as secondary antibodies. The signal was detected by enhanced chemiluminescence (Perkin-Elmer, Boston, MA). The membranes were then exposed to Kodak Biomax Light-1 films.

2.4 RESULTS

2.4.1 BIV Rev fused to EGFP predominantly localizes to the nucleoli

As reported in a previous study, BIV Rev localizes predominantly into the nucleus and nucleoli of infected cells as determined by immune gold staining (Oberste et al., 1993). To confirm the intracellular distribution of BIV Rev, HEK 293 cells were cotransfected with plasmids pEGFP-RevWT, encoding EGFP in fusion with BIV Rev, and pDsRed, encoding the RFP used as a total cell marker. As shown in Figure 2.1A, the EGFP-Rev fusion protein localized into the nucleus and more predominantly into the nucleoli of the transfected cells. About 5 to 10% of the transfected cells showed the presence of Rev within the cytoplasm, indicating a rapid nuclear transport and accumulation. This distribution pattern was also observed in all other cells tested. The predominant nucleus and nucleolus localization pattern observed here with pEGFP-Rev was also confirmed by immunofluorescence where Rev was fused to the c-Myc tag (Figure 2.2C, WT panel). Finally, the main nucleolar localization of the EGFP-Rev fusion protein was also observed in BIV-permissive canine (Cf2Th) and bovine (MDBK) cells (not shown) and in simian (Vero) cells, suggesting that this localization is not species specific. Because Vero cells offer a small nucleus/cytoplasm volume ratio and contain a small number of well-defined and easy-to-observe nucleoli, subsequent experiments, unless otherwise specified, were conducted with these cells.

To identify more precisely the nucleolar distribution of BIV Rev, Vero cells were cotransfected with pEGFP-Rev and each of the plasmids containing well-known nucleolar protein markers in fusion with DsRed, namely, nucleolin (pDsRed-Nucleolin), fibrillarin (pDsRed-Fibrillarin), and B23.1 (pDsRed-B23.1). As shown in Figure 2.1B, the nucleolar distribution of BIV Rev was similar to that of nucleolin (subpanels a to c) and of B23.1 (subpanels e to g). In contrast, the BIV Rev did not

colocalize with fibrillarin (subpanels i to k). Finally the results also indicated that Rev accumulates, in a significant number of cells, at the periphery of the nucleoli (arrow in Figure 2.1B, subpanels a, e, and i), an observation previously reported elsewhere (Oberste et al., 1993).

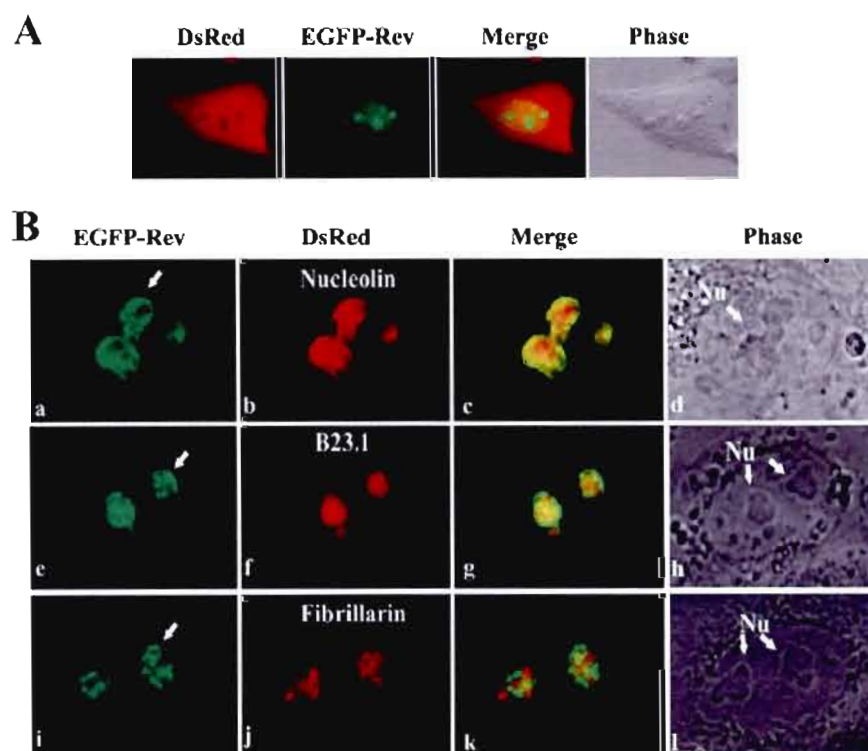


Figure 2.1. Nuclear and nucleolar localization of BIV Rev WT protein in fusion with EGFP (EGFP-Rev). (A) Confocal fluorescence microscopy analyses of EGFP-Rev (in green) and DsRed (in red) proteins transiently expressed in HEK 293 cells 24 h after cell transfection. DsRed protein was used as a whole-cell marker. The phase-contrast image of the cell is also shown. (B) Confirmation of the nucleolar localization of BIV EGFP-Rev. Vero cells were cotransfected for 24 h with pEGFP-RevWT and either pRed-C1Nucleolin (a to d), pRed-C1B23.1 (e to h), or pRed-C1Fibrillarin (i to l) vectors. The merge images represent the superposition of EGFP and either DsRed-Nucleolin, DsRed-B23.1, or DsRed-Fibrillarin images. The phase-contrast images of the cells are also shown. The arrows in panels a, e, and i indicate the accumulation of EGFP-Rev in the perinucleolar region of the cell. Nu, nucleoli. The images shown are representative of expression patterns (three independent experiments) observed in >70% of the cells.

2.4.2 Intracellular localization of BIV Rev deletion mutants

In order to identify the region required for nuclear localization, we generated a series of 20- to 30-aa-long-deletion Rev mutants. The mutated Rev sequences were cloned in plasmid pEGFP or pcDNA3.1 Myc/HisB to produce two types of Rev-tagged proteins: the Rev-EGFP protein, in which Rev is fused to the C-terminal end of EGFP, and the Myc/His-Rev protein, in which Myc/His is fused to its C-terminal end (Figure 2.2A). Western blot analyses revealed that all pEGFP constructs (Rev WT and mutated) were expressed at comparable levels upon transfection of Vero cells at the expected sizes (Figure 2.2B). Similar results were obtained in cells transfected with the pcDNA3.1 Myc/His Rev WT and mutated constructs (data not shown).

The subcellular distribution of the deletion mutant proteins was analyzed by fluorescence microscopy. The results showed that six of the nine Rev mutants (M1, M2, M3, M6, M7, and M9) had a predominant nuclear/nucleolar localization similar to that of the WT version (Figure 2.2C). In contrast, mutants M4 and M5, both with an aa 71 to 110 segment deletion, showed a diffuse cytoplasmic distribution with a slight M5 nuclear localization (Figure 2.2B). Both mutant proteins did not accumulate in the nucleus or nucleoli as observed for the Rev WT (Figure 2.2C). In contrast to the EGFP-tagged proteins, we could readily detect the Myc/His-tagged M4 and M5 mutants in the nucleus of transfected cells (Figure 2.2B and data not shown). The nuclear localization of these mutated proteins was attributed to the low molecular weight of these proteins, conferring on them the ability to enter the nucleus through nuclear pores. No c-Myc or His signals were observed in cells transfected with empty plasmids (not shown). Interestingly, although mutant M8 (Δ 151-170) displayed nuclear and nucleolar localizations similar to those of the WT, a higher proportion of cells (40%) showed the presence of the M8 mutant protein in the cytoplasm than that of cells expressing Rev WT (<10% of positive cells) (Figure 2.2C). Although this finding was not addressed in this study, the presence of M8 in the cytoplasm is

consistent with the dynamics of the cell nucleolus with the nucleoplasm, the alteration of which may result in either enrichment or exclusion of a particular protein in the nucleolus (Emmott et Hiscox, 2009), and, ultimately, in the nucleus with a possible spill over in the cytoplasm.

After having established the subcellular localization of BIV Rev WT and each of the Rev mutant proteins, we wished to determine the impact of the mutations on the nuclear export activity of these proteins. This was assessed by a transient-transfection assay using the pRRE-BIV CAT reporter construct. This construct contains the CAT gene and a region containing the putative BIV RRE (Molina et al., 2002) located within an intron flanked by HIV-1 splice sites (Huang et al., 1991). By using this construct, unspliced transcripts of pRRE-BIV containing the CAT sequence enter in the cytoplasm only if Rev is present. In the absence of Rev, only traces of CAT activity are detected. As shown in Figure 2.2D, M4, M5, and M6 mutated Rev proteins did not exert CAT activity, whereas all other mutants showed CAT activity comparable to that of Rev WT. The results obtained with M4 and M5 correlate with cytoplasmic localization of the proteins with no or negligible (for M5) distribution in the nucleus (Figure 2.2C). Similar results for CAT activity were obtained with the EGFP-Rev WT and mutant fusion proteins (not shown). The lack of CAT activity obtained with the M6 mutant is associated with the fact that the amino acid sequence deleted in that protein contains the nuclear export signal of BIV Rev, which allows the exportation of unspliced transcripts in the cytoplasm where they are translated (A. Gomez Corredor and D. Archambault, unpublished data).

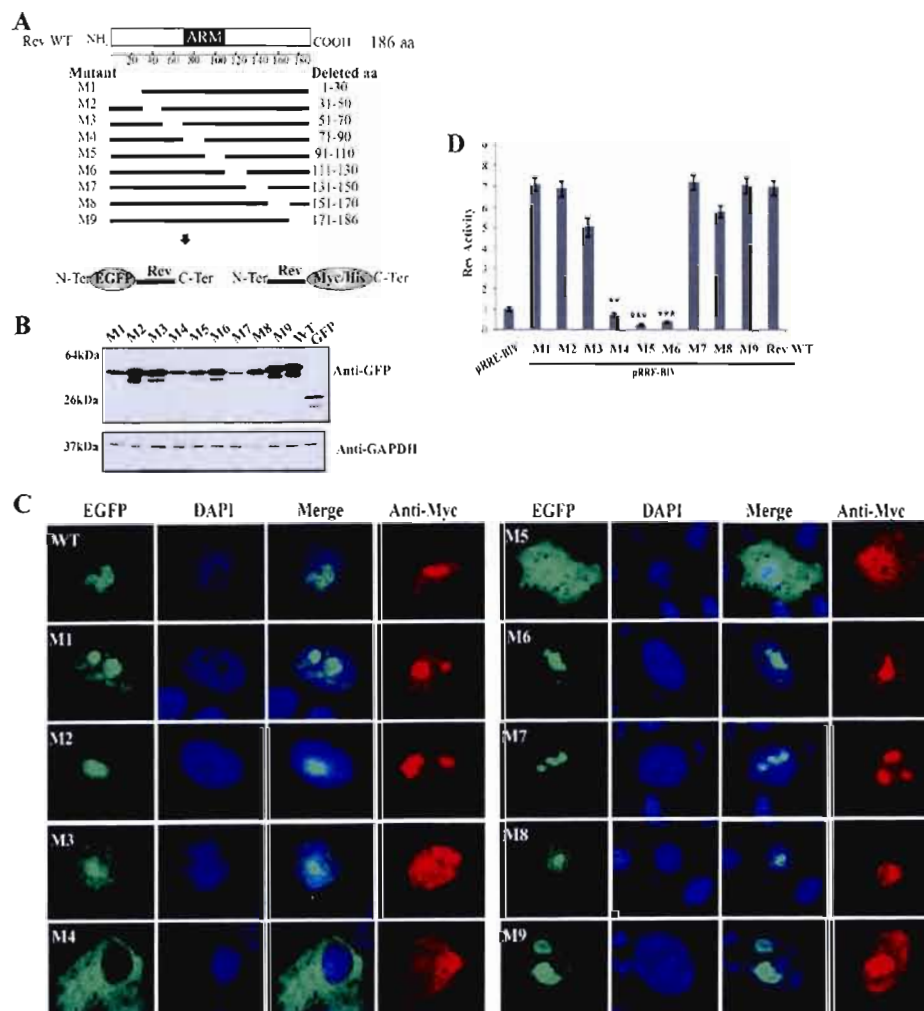


Figure 2.2. Analysis of BIV Rev protein deletion mutants reveals the importance of aa 71 to 110 for the intracellular localization of Rev. (A) The predicted functional motifs in BIV Rev are shown. Terminal and internal deletions were carried out from pcDNA3.1RevWT by PCR-ligation-PCR. The resulting constructs were cloned into the expression vectors pEGFP-C1 and pcDNA3.1Myc/HisB to generate the Rev amino acid deletion mutant proteins (M1 to M9). (B) Expression analyses of Rev WT and Rev mutant proteins in fusion with EGFP by Western blotting from Vero cells transfected with the appropriate plasmid constructs. Total cell proteins (50 μ g) were separated on 15% SDS-polyacrylamide gels, electroblotted onto a nitrocellulose membrane, and probed with GFP-specific antibodies. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) immunostaining was used as a loading control. The molecular masses of the expressed proteins are indicated in the left margin. (C) Fluorescence microscopy analyses of Rev WT (WT) and Rev mutant (M1 to M9)

proteins fused to EGFP or c-Myc/His tags. Vero cells were transfected with the respective plasmid constructs. After 24 h of incubation, the cells were fixed and counterstained with DAPI (in blue). The expression of EGFP fusion proteins is shown in green. The merge image represents the superposition of EGFP and DAPI images. The c-Myc/His-tagged proteins were visualized by indirect immunofluorescence using a Myc-specific primary antibody and an anti-mouse Cy3 secondary antibody. The images shown are representative of expression patterns (three independent experiments) observed in >70% of the cells. (D) Nuclear export activity of Rev-Myc/His WT and Rev-Myc/His mutants (M1 to M9) was determined using a CAT reporter assay. Fifty micrograms of cell lysate was used in the CAT assay. The CAT levels were normalized to the β -galactosidase activity. The results represent mean values of triplicate samples of at least three separate experiments. Rev activity is expressed as the ratio of Rev WT or mutant CAT expression to basal expression of pRRE-BIV alone. Vertical bars indicate the standard deviations about the means. The values significantly different from Rev WT, according to a two-tailed *t* test, are indicated by asterisks: **, $P < 0.005$; ***, $P < 0.0005$.

2.4.3 Two regions are essential for the nuclear localization of BIV Rev

Nucleo-nucleoli-cytoplasmic trafficking of molecules is mediated by the NLS and NoLS (Dingwall et Laskey, 1991; Lohrum et al., 2000; Emmott et al., 2008). To determine whether the deleted region (aa 71 to 110) in M4 and M5 mutants functions as a bona fide NLS-NoLS, we directly fused this putative NLS-NoLS (40-aa) sequence to the C terminus of an EGFP (Figure 2.3A). The expression of EGFP and of the EGFP fusion proteins in transfected Vero cells was confirmed by Western blot analysis (Figure 2.3B). As expected, the control EGFP showed diffuse distribution in both the cytoplasm and the nucleus, whereas the EGFP-NLS-NoLS (EGFP 71-110_{Rev}) fusion protein exclusively localized to the nucleus of HEK 293 and Vero cells (Figure 2.3C). In addition, EGFP71-110_{Rev} readily colocalized with the DsRed-Nucleolin into the nucleoli (Figure 2.3C). These results clearly indicated that two regions within the M4 and M5 mutants that encompass aa 71 to 110 in BIV Rev contain functional NLS and NoLS that direct a cytoplasmic protein to the cell nucleus and nucleoli.

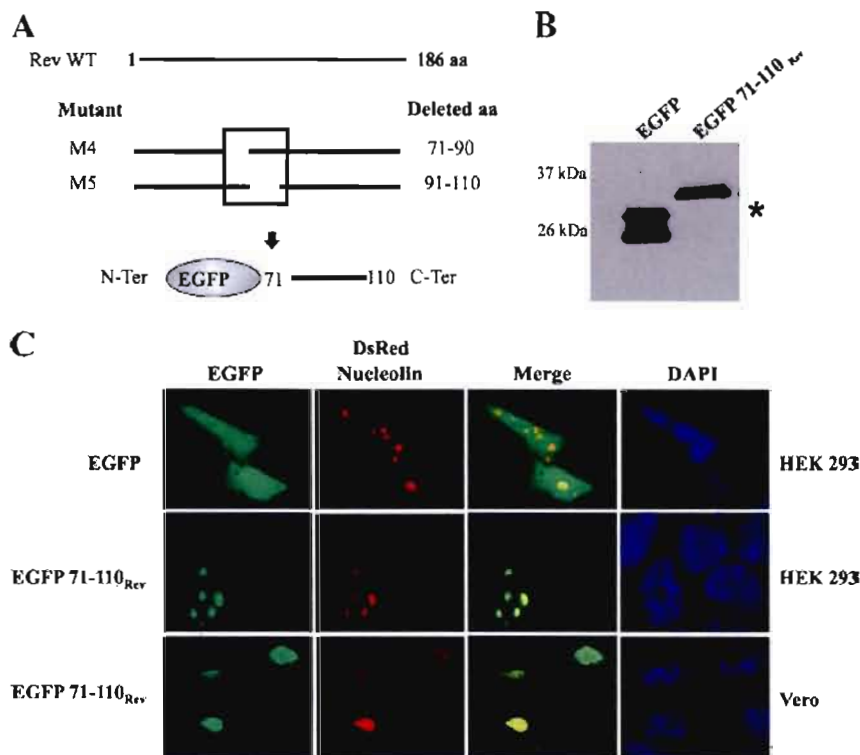


Figure 2.3. The region encompassing aa 71 to 100 of BIV Rev protein is associated with NLS and NoLS functions. (A) The region deleted in M4 and M5 Rev mutants was fused in the C-terminal end of EGFP, known to have diffuse localization in transfected cells. (B) Expression analysis of EGFP and EGFP 71-110_{Rev} by Western blot assays of Vero cells transfected with the appropriate constructs. Total cell proteins (50 µg) were separated on 15% SDS-polyacrylamide gels, electroblotted onto a nitrocellulose membrane, and probed with GFP-specific antibodies. The molecular masses of the expressed proteins are indicated in the left margin. The asterisk indicates EGFP. (C) HEK 293 and Vero cells were cotransfected with pEGFP or pEGFP71-110_{Rev} and with pRed-C1Nucleolin plasmids. After 24 h of incubation, the cells were fixed and counterstained with DAPI (in blue). Expression of the proteins was detected via the fluorescence of EGFP (in green) or RFP (in red). The merge image represents the superposition of EGFP and DsRed-Nucleolin images. The images shown are representative of the expression patterns (three independent experiments) observed in >70% of the cells.

2.4.4 The NLS motif in BIV Rev is bipartite

NLSs and NoLSs are mainly composed of basic residues (Lange et al., 2007; Emmott et Hiscox, 2009). As shown in Figure 2.4A, analysis of the sequence encompassing the aa 71 to 110 region of BIV Rev that contains the putative NLS and NoLS reveals four distinct clusters of basic amino acids (RARK, RR, RRKQERR, and RR) in addition to two separate K and R residues at positions 85 and 88, respectively. To determine which amino acids are necessary for the NLS-NoLS function of BIV Rev, we first generated a series of Rev mutants with deletions specific for each of the basic amino acid clusters. These mutants were then fused to EGFP (Figure 2.4A). The constructs were then used to transfect Vero cells that were thereafter examined for subcellular localization of the mutated proteins.

As Rev is a nucleocytoplasmic shuttling protein, experiments in cells were conducted in the presence or absence of LMB, an inhibitor of Rev nuclear export. Deletion of the first cluster (Rev $\Delta 1$; aa 71 to 74) slightly affected the subcellular distribution of the Rev-EGFP fusion protein in cells untreated with LMB, as demonstrated by a noticeable cytoplasmic localization (Figure 2.4B). This result was not observed with EGFP-Rev WT (Figure 2.1A). As expected, treatment of cells with LMB resulted in only nuclear and nucleolar localization of Rev $\Delta 1$. Deletion of the arginine residues at positions 79 and 80 in Rev $\Delta 2$ had no effect on the nuclear localization (Figure 2.4B). However, these deletions completely abolished the nucleolar localization of the Rev protein in both LMB-untreated and LMB-treated cells. The deletion of the third cluster (Rev $\Delta 3$) (encompassing aa 95 to 101) disrupted intracellular distribution. In the absence of LMB, the Rev $\Delta 3$ protein was found not in the nucleus but rather in the cytoplasm and nucleoli. This nucleolus localization was confirmed by the colocalization of the mutated protein with DsRed-Nucleolin. In contrast, in the presence of LMB, the Rev $\Delta 3$ fusion protein was localized only into the nucleus and nucleoli (Figure 2.4B). Taken together, these

results indicate that the deleted residues in Rev $\Delta 3$ are necessary for the nuclear retention of BIV Rev and suggest that another region allows the entrance of the protein in the nucleus, indicating a possible bipartite NLS for BIV Rev. Finally, the last cluster of basic residues deleted in Rev $\Delta 4$ (aa 106 and 107) had no effect on the subcellular distribution of BIV Rev, indicating that these residues are not important for the nuclear localization of BIV Rev (Figure 2.4B).

To confirm the results described above and to identify the amino acid residues of the NLS in BIV Rev, we generated a series of site-directed mutations in the basic residues present in the aa 71 to 110 sequence by replacing the arginine (R) and lysine (K) residues with alanine (A) residues (Table 2.1). The results obtained with the most relevant mutants are shown in Figure 2.4. Single sets of substitutions of residues $^{71}\text{RARK}^{74}$ to $^{71}\text{AAAA}^{74}$ (Mut 15), $^{95}\text{RRK}^{97}$ to $^{95}\text{AAA}^{97}$ (Mut 6), or $^{100}\text{RR}^{101}$ to $^{100}\text{AA}^{101}$ (Mut 10) affected the proportion of the protein localized in the cytoplasm compared to the WT form of Rev (EGFP-Rev) (Figure 2.4C and 2.1A). Interestingly, the combination of both $^{71}\text{RARK}^{74}$ to $^{71}\text{AAAA}^{74}$ and $^{100}\text{RR}^{101}$ to $^{100}\text{AA}^{101}$ (Mut 20) mutations disrupted the nuclear distribution of the mutated EGFP-Rev protein although the protein retained a nucleolar and cytoplasmic localization. Thus, cluster residues ($^{95}\text{RRK}^{97}$ and $^{100}\text{RR}^{101}$) are necessary for the nuclear localization of EGFP-Rev. Finally, the combined mutations $^{71}\text{RARK}^{74}$ to $^{71}\text{AAAA}^{74}$, $^{95}\text{RRK}^{97}$ to $^{95}\text{AAA}^{97}$, and $^{100}\text{RR}^{101}$ to $^{100}\text{AA}^{101}$ (Mut 24) completely abolished the nuclear localization of the mutated EGFP-Rev, which was exclusively confined to the cytoplasm (Figure 2.4C). Combined, the results indicate the presence of a bipartite NLS in BIV Rev that is composed of residues $^{71}\text{RARK}^{74}$ and of $^{95}\text{RRK}^{97}/^{100}\text{RR}^{101}$.

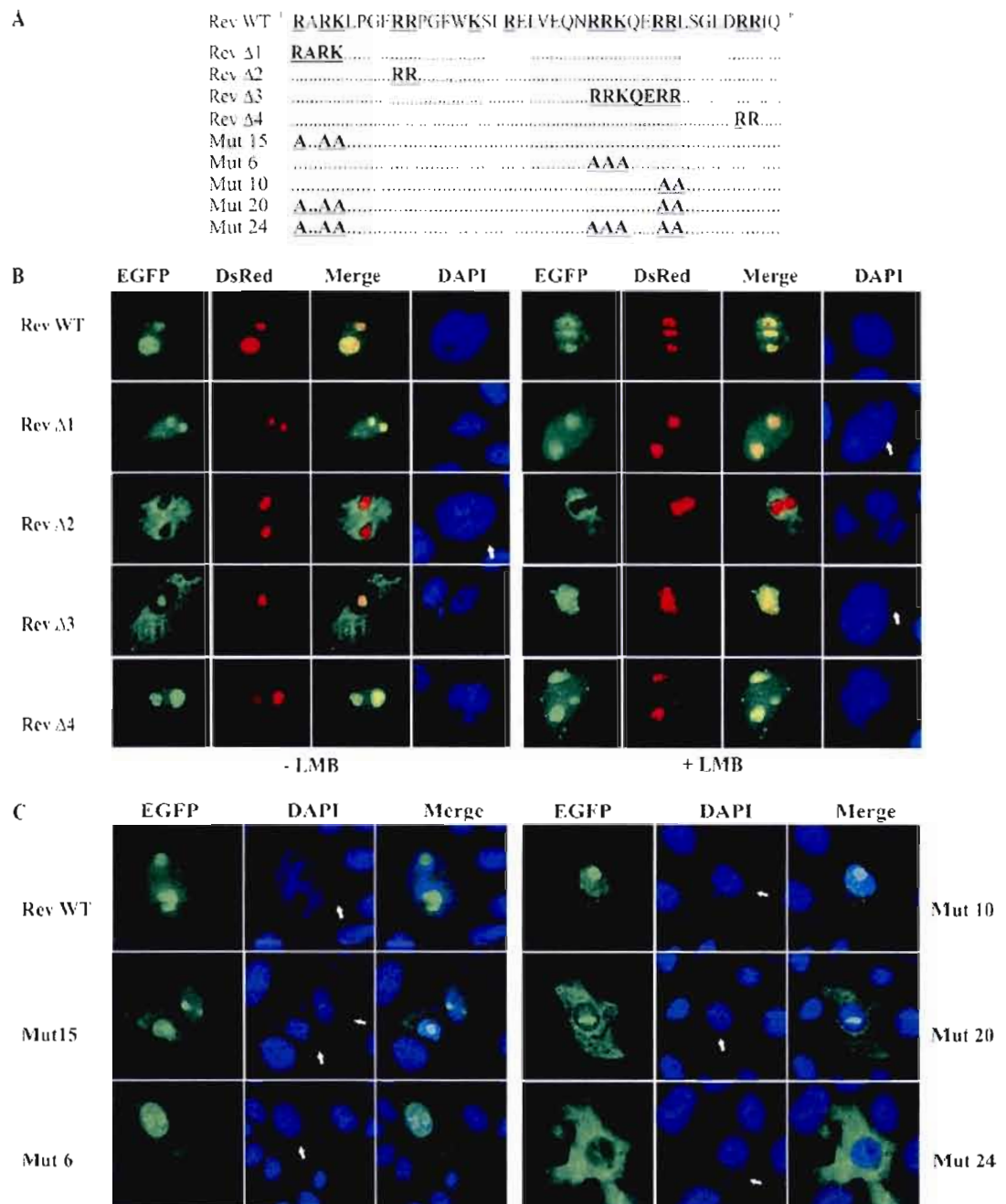


Figure 2.4. The NLS of the BIV Rev protein is of a bipartite type. (A) Several pEGFP-Rev deletion (Rev Δ1 to Rev Δ4) and alanine substitution (Mut 15, Mut 6, Mut 10, Mut 20, and Mut 24) mutant constructs targeting the aa 71 to 110 sequence of BIV Rev were generated from pEGFP-Rev WT. (B) Subcellular localization of

EGFP-Rev deletion mutants by fluorescence microscopy. Vero cells were cotransfected for 24 h with pRed-C1Nucleolin and each of the pEGFP-Rev deletion constructs described for panel A in the presence or absence of 5 nM LMB and incubated for 24 h. The cells were fixed, counterstained with DAPI (in blue), and examined by fluorescence microscopy. The merge image represents the superposition of EGFP and DsRed-Nucleolin images. (C) Subcellular localization of EGFP-Rev alanine substitution mutants. Vero cells were transfected with each of the indicated pEGFP-Rev mutant constructs. The merge image represents the superposition of EGFP and DAPI images. The images shown are representative of the expression patterns (three independent experiments) observed in >70% of the cells.

2.4.5 The NoLS of BIV Rev

After having mapped the bipartite NLS in BIV Rev, we wished to identify the amino acid residues important for the nucleolar localization of the protein. To this end, we used the various mutated Rev versions described above in which the basic residues were changed to alanines in the region encompassing aa 71 to 110. In doing so, we were able to confirm the results obtained with the Rev $\Delta 2$ mutated protein (Figure 2.4B). Indeed, alterations of $^{79}\text{RR}^{80}$ to $^{79}\text{AA}^{80}$ in EGFP-Rev (Mut 3) resulted in the localization of the protein to the nucleus but not in nucleoli (Figure 2.5). Moreover, alterations of ^{88}R to A (Mut 5) and ^{95}R to A (Mut 7) in BIV EGFP-Rev disrupted the nucleolar localization of the protein with no effect on its nuclear localization (Figure 2.5). Combined, the results demonstrated that residues $^{79}\text{RR}^{80}$, ^{88}R , and ^{95}R are essential for the nucleolar targeting of BIV Rev.

A Rev WT ⁷¹RARKLPGERRRPGFWKSLRELVEQNRRKQERR¹⁶
 Mut 3AA.....
 Mut 5A.....
 Mut 7A.....

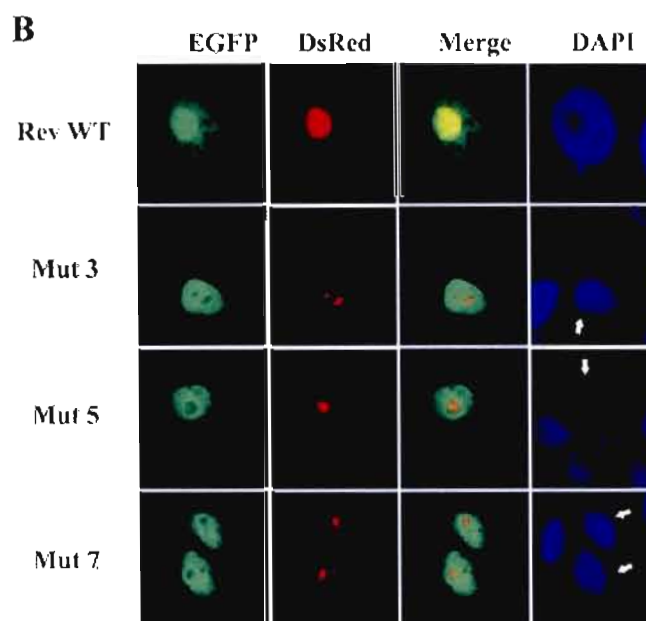


Figure 2.5. Identification of amino acid residues necessary for the nucleolar localization of BIV Rev protein. (A) Alanine substitutions were introduced into the EGFP-Rev WT to generate the pEGFP-Rev Mut 3, Mut 5, and Mut 7 mutant constructs. (B) Vero cells were transfected with pRed-C1Nucleolin and each of the indicated pEGFP-Rev mutant constructs. After 24 h of incubation, the cells were fixed, counterstained with DAPI (in blue), and examined by fluorescence microscopy. The expression of EGFP-Rev mutant proteins and DsRed-Nucleolin is shown in green and red, respectively. The merge image represents the superposition of EGFP and DsRed-Nucleolin images. The image shown is a representative of the expression pattern (three independent experiments) observed in >70% of cells.

2.4.6 Functional analysis of BIV Rev NLS and NoLS mutants

To determine whether mutations of BIV Rev NLS and NoLS amino acid residues had an impact in the nuclear export activity of the protein, Vero cells were cotransfected with the Rev-EGFP WT-encoding plasmid or each of the BIV Rev NLS and NoLS mutant plasmids and the pRRE-BIV CAT reporter construct as described

above. The results showed that among all Rev NLS mutants tested (Figure 2.6), only Mut 15 displayed an activity comparable to that of Rev WT. In contrast, the Mut 10 and Mut 20 mutants showed lower activity (at least 50%) than did Rev WT even though the proteins were present in the nucleus and the nucleoli, respectively (Figure 2.4C). In contrast, the Mut 24 mutant, which was not localized in the nucleus and nucleoli, had no activity at all. Similarly, no activity was associated with the Mut 6 mutant despite its presence in the nucleus and nucleoli (Figure 2.4C). When determining the activity of NoLS mutants (Figure 2.6), Mut 3 and Mut 7 had activity comparable to or lower than that of Rev WT, respectively. In contrast, the Mut 5 mutant had no activity at all. As mentioned above, all of these mutants were localized only in the nucleoplasm.

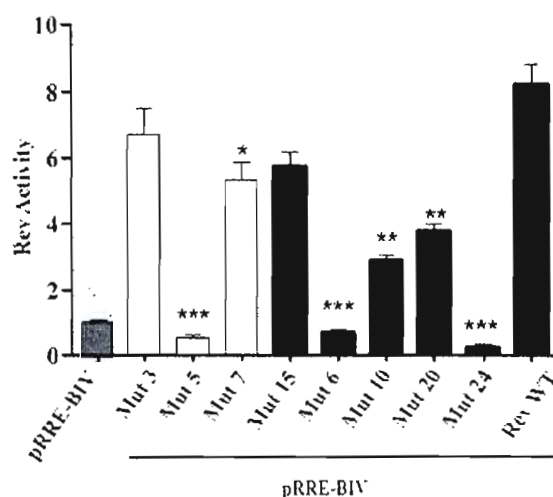


Figure 2.6. Functional analysis of BIV Rev NLS and NoLS mutants. Functional analysis of BIV Rev NLS and NoLS mutants. The nuclear export activities of EGFP-RevWT and EGFP-Rev NLS and NoLS mutants described for Figure 2.4 and 2.5 were determined using a CAT reporter assay as described for Figure 2.2C. Gray bar, pRRE-BIV alone; solid bars, NLS mutants; open bars, NoLS mutants. The results represent mean values of triplicate samples of at least three separate experiments. Vertical bars indicate the standard deviations about the means. The values significantly different from those for the Rev WT, according to a two-tailed *t* test, are indicated by asterisks: *, $P < 0.05$; **, $P < 0.005$; ***, $P < 0.0005$.

2.5 DISCUSSION

The Rev and Rev-like proteins of complex retroviruses are essential regulatory proteins that mediate nuclear export of partially spliced viral RNAs via functional domains that interact with cellular proteins and viral RNA. To exert their activity, lentivirus Rev proteins must enter the nucleus through NLSs (Kubota et al., 1989; Cochrane, Perkins et Rosen, 1990; Truant et Cullen, 1999; Lee et al., 2006). Most nuclear proteins are targeted to the nucleus by mono- or bipartite basic aa sequences that constitute the NLS (Dingwall et Laskey, 1991; Robbins et al., 1991; Lange et al., 2007). In HIV-1 Rev, a 17-aa arginine-rich motif (Table 2.2) is located within the N-terminal half of the protein and serves as both the RRE-binding domain and the NLS (Hope et al., 1990a). In addition to NLSs, HIV-1 and HTLV-1 target Rev and Rex proteins, respectively, to the nucleolus via NoLS (Kubota et al., 1989; Cochrane, Perkins et Rosen, 1990).

The present study is the first to directly characterize the cellular distribution of BIV Rev in details. We have demonstrated that the Rev protein of BIV localizes almost exclusively into the nucleus and the nucleoli of transiently transfected cells (Figure 2.1), confirming a previous study conducted in BIV-infected cells (Oberste et al., 1993). By using a series of Rev deletion mutants fused to the EGFP-encoding sequence, we thereafter identified the sequence necessary for the nuclear localization of BIV Rev. The subcellular localizations of both M4 and M5 mutants were disrupted as these proteins were distributed in the cytoplasm and the nucleus (Figure 2.2C), a feature that contrasts with the predominant nuclear/nucleolar distribution of the Rev WT protein. Moreover, the biological activity of both M4 and M5 mutants was completely abolished in the CAT reporter assay (Figure 2.2D). These results indicated that the regions deleted in M4 and M5 (aa 71 to 90 and aa 91 to 110, respectively) were important for the biological activity and intracellular localization of BIV Rev.

The localization results also suggested the presence of a bipartite NLS in BIV Rev. To confirm the latter, we fused the aa 71 to 110 region to the C-terminal end of the EGFP protein and found that this sequence was sufficient to relocate the GFP into the nucleus and the nucleoli (Figure 2.3).

The hallmark of bipartite NLSs is the presence of two clusters of basic aa whose integrity is essential for their function (Robbins et al., 1991). As the amino acid deletion region in M4 and M5 contains several clusters of basic amino acid residues (Figure 2.4A), we wished to identify which basic amino acid clusters were at play for the bipartite NLS function of BIV Rev. By using a series of deletions and point mutations within the Rev WT protein, we found that both the $^{71}\text{R-RK}^{74}$ (Rev $\Delta 1$ mutant) and $^{95}\text{RRK-RR}^{101}$ (Rev $\Delta 3$ mutant) basic residues were important for the nuclear localization of BIV Rev WT (Figure 2.4). Interestingly, the $^{71}\text{R-RK}^{74}$ cluster alone was able to transport the protein into the nucleus as shown by the result from the Rev $\Delta 3$ mutant, which contains an intact $^{71}\text{R-RK}^{74}$ sequence. The latter mutant localized into the nucleoli and cytoplasm without nuclear accumulation in the absence of LMB (Figure 2.4B). In contrast, in the presence of LMB, which blocks the putative exportation activity of Rev, the Rev $\Delta 3$ mutant was completely retained in the nucleus and nucleoli (Figure 2.4B). Notably, in the $^{71}\text{RARK}^{74}$ and $^{100}\text{RR}^{101}$ to $^{71}\text{AAAA}^{74}$ and $^{100}\text{AA}^{101}$ mutant (Mut 20) (Figure 2.4C), only the last two residues of the second cluster of basic residues ($^{95}\text{RRK-RR}^{101}$) are mutated to alanines. This mutant showed the same localization pattern as that of the Rev $\Delta 3$ mutant. Combined, these results suggest that the $^{71}\text{R-RK}^{74}$ cluster mediates the transport of the protein into the nucleus and that the integrity of the $^{95}\text{RRK-RR}^{101}$ cluster is necessary for both the nuclear localization and the retention of Rev. Our results unequivocally showed that the NLS of BIV Rev is bipartite and is composed of residues $^{71}\text{R-RK}^{74}$ and $^{95}\text{RRK-RR}^{101}$. This is the first report of a bipartite NLS for any Rev/Rex/Rev-like proteins in complex retroviruses. However, as shown in Table 2.2, the sequence of the

two basic motifs in BIV Rev NLS differs from the consensus sequences reported for typical short- and long-type bipartite NLSs. Moreover, our results showed that the length of the spacer region (20 aa) separating the two basic clusters of BIV Rev NLS differs from the 8- to 16- and the 30- to 32-aa lengths described for the short- and long-type bipartite NLSs, respectively (Robbins et al., 1991; Jans et al., 1995; Weis, Mattaj et Lamond, 1995; Luo et Shibuya, 2001; Romanelli et Morandi, 2002; Yeung, Zhang et Chen, 2006). Although human cytidine deaminase and the integrase of HIV-1 have been reported to contain bipartite NLSs with spacer regions of 20 (Table 2.2) and 22 aa, respectively, the NLSs of these proteins were composed mainly of lysine residues (Gallay et al., 1997; Somasekaram et al., 1999). This contrasts with the predominantly arginine residues described here. Combined, the results showed that BIV Rev contains a novel type of bona fide bipartite NLS.

TABLE 2.2. NLSs and NoLSs^a

| Protein ^c | NLS/NoLS ^b | Reference(s) |
|-------------------------------|--|--------------------------------|
| Bipartite NLS | | |
| Short-type NLSs | | |
| Nucleoplasmin | KRPAATKKAGQAKKKKLDK | (Robbins et al., 1991) |
| CBP80 | RRRHSDENDGGQPHKRRK | (Weis, Mattaj et Lamond, 1995) |
| hRAC3 | RKRKLPCDTPGQGLTCSGEKRRR | (Yeung, Zhang et Chen, 2006) |
| Sw15 | KKYENVVIKRSRKRGRPRK | (Romanelli et Morandi, 2002) |
| Consensus | [RK] (3), 8 to 16 aa [R/K] (4) | (Romanelli et Morandi, 2002) |
| Long-type NLSs | | |
| HnRNP1 | KRGSELFSTCVTNGPFIMSSNSASAANGNDSKKFKGDS | (Romanelli et Morandi, 2002) |
| HIF- α | KRKMEHDGSLFQAVGIGTLLQQPDDHAATTSLSWKRVKG | (Luo et Shibuya, 2001) |
| Consensus | [KR] 30 to 32 aa [R/K] (4) | (Romanelli et Morandi, 2002) |
| Unclassified-type NLSs | | |
| HCDA | KRPACTLKPECVQQLLVCSQEAKK | (Somasekaram et al., 1999) |
| Rev BIV | RARKLPGERRPGFWKSLRELVEQNRRKQERR | This study |

Viral and cellular monopartite NLSs and/or NoLSs

| | | |
|----------------------|--|--|
| Rev, HIV-1 | <u>RQARRN</u> RRRR WRERQRQ | (Kubota et al., 1989; Cochrane, Perkins et Rosen, 1990) |
| Rev, EIAV | KRRRK | (Lee et al., 2006) |
| Rem, MMTV | ALRRKRR REMRK | (Indik et al., 2005) |
| Rex, HTLV-1 | PKTRRRP RRSQR KRP PTP | (Kubota et al., 1989; Nosaka et al., 1989; Narayan et al., 2003) |
| Rec, HERV-K | RRRR HRNRAP | (Yang et al., 1999) |
| Tat, HIV-1 | RKKRR <u>QRRRA</u> HQ | (Siomi et al., 1990; Daelemans et al., 2004) |
| hLa | <u>SKGRR</u> <u>FKG</u> <u>GK</u> GK | (Horke et al., 2004) |
| MDM2 | <u>KKLK</u> <u>KRNK</u> | (Lohrum et al., 2000) |
| Consensus NoLS motif | <u>R/K-R/K-X-R/K</u> | (Lohrum et al., 2000; Emmott et Hiscox, 2009) |
| BIV Rev NoLS | <u>ERRPGFWKSLRELVEQNR</u> | This study |

^a Sequences of known short- and long-type bipartite NLSs and of NoLSs of various viral and cellular proteins with their respective consensus sequences in comparison with the novel type of bipartite NLS and NoLS sequences of BIV Rev protein.^b The basic residues associated with NLSs are in bold, and the residues of NoLSs are underlined. The possible number of basic residues in the consensus sequences is indicated in parentheses.^c Abbreviations: CBP80, CAP-binding protein 80; hRAC3, human receptor coactivator 3; Sw15, *Saccharomyces cerevisiae* transcription factor; HnRNP1, heterogeneous nuclear ribonucleoprotein; HIF- α , hypoxia-inducible factor α ; HCDA, human cytidine deaminase; MMTV, mouse mammary tumor virus; HERV-K, human endogenous retrovirus K; Tat, *trans* activator factor of transcription; hLa, human La protein; MDM2, murine double minute 2 protein

The nucleus is a highly ordered structure containing several nonmembrane subcompartments, the largest subnuclear structure of which is the nucleolus. The nucleolus is morphologically divided into discrete regions including the fibrillar center, the dense fibrillar center (DFC), and the granular component (GC) (Emmott et Hiscox, 2009). Beside the demonstrated role of the nucleolus in various steps of rRNA synthesis, a plurifunctional nucleolus hypothesis has been formulated and proposes that the nucleolus has multiple functions in health and disease (Matthews et Olson, 2006; Stark et Talianky, 2009). In addition, the nucleolus can be a target for

viral infection (Hiscox, 2007). For instance, changes in nucleolar structure can result from the coronavirus infectious bronchitis virus or from herpes simplex virus infection (Dove et al., 2006; Lymberopoulos et Pearson, 2007; Bertrand et Pearson, 2008). Consistent with this and similar to what was previously reported for HIV-1 Rev (Nosaka et al., 1993), we also observed, in certain cell lines, altered nucleolar structure upon BIV Rev expression (not shown), an event that could be attributed to nucleolar accumulation of the protein (Lymberopoulos et Pearson, 2007; Bertrand et Pearson, 2008).

The nucleolar targeting of a protein depends on the presence of an NoLS or, in the absence of the latter, on interactions with nucleic acids or other NoLS-containing proteins that form a hub of proteins which, in turn, allows the binding of several protein partners (Emmott et Hiscox, 2009). Here, we confirmed the nucleolar localization of the BIV Rev protein (Oberste et al., 1993). We also showed that the BIV Rev protein did not colocalize with fibrillarin, which is known to localize in the DFC region of the nucleolus (Figure 2.1B). In contrast, the BIV Rev protein colocalized with two other nucleolar markers, namely, nucleolin, known to localize in the GC and DFC region of the nucleolus, and B23.1, an isoform of B23 known to localize in the nucleolar GC (Dundr, Misteli et Olson, 2000; Emmott et al., 2008). As HIV-1 Rev was shown to colocalize and interact with B23 (Fankhauser et al., 1991; Dundr et al., 1995; Dundr et al., 1996), it is possible that BIV also may interact with nucleolin and/or B23.1, an assumption that needs further studies.

We showed that BIV Rev contains an NoLS that mediates the nucleolar localization of this protein. We also showed that residues ⁷⁹RR⁸⁰, ⁸⁸R, and ⁹⁵R are essential for the nucleolar localization of BIV Rev (Figure 2.4B and 2.5). Interestingly, none of the alanine substitutions within the NoLS disrupted the nuclear

localization of BIV Rev (Figure 2.5), thereby suggesting that the NoLS is independent of NLS function. HIV-1 Rev, HTLV Rex, and HIV-1 Tat proteins possess an NoLS that is intrinsically associated with the NLS (Kubota et al., 1989; Nosaka et al., 1989; Cochrane, Perkins et Rosen, 1990; Siomi et al., 1990). These proteins contain an R/K-R/K-X-R/K consensus NoLS motif that is also present in a variety of other viral and cellular nucleolar proteins (Dang et Lee, 1989; Hatanaka, 1990; Lohrum et al., 2000; Horke et al., 2004) (Table 2.2). Remarkably, the BIV Rev does not harbor such a consensus motif, as several amino acid residues are present between the arginine residues associated with its NoLS function (Table 2.2). Like BIV Rev, the three NoLS sequences identified in parafibromin, a tumor suppressor protein, also differ from the consensus arginine/lysine motifs present in nucleolar proteins described so far (Hahn et Marsh, 2007; Emmott et Hiscox, 2009). In addition, the parafibromin NoLSs are localized in a region of the protein that is not intrinsically associated with the bipartite NLS (Hahn et Marsh, 2007). This contrasts with our results, where the ⁷⁹RR⁸⁰ and ⁸⁸R residues of the Rev NoLS are localized between the two basic amino acid clusters that form the BIV Rev bipartite NLS and where the ⁹⁵R residue is part of the second cluster of the bipartite NLS (⁹⁵RRK-RR¹⁰¹). Thus, the BIV Rev protein harbors a novel type of NoLS different from NoLS motifs previously described for any viral or cellular proteins.

The NLS/NoLS and RBD motifs in several Rev/Rex/Rev-like proteins in complex retroviruses are closely associated to arginine-rich domains (Hope et al., 1991; Pollard et Malim, 1998; Yang et al., 1999; Magin et al., 2000; Indik et al., 2005). Here we found that the nuclear export activity of the BIV Rev NLSs and NoLS mutants was diminished (Mut 7, Mut 10, and Mut 20) or absent (Mut 5 and Mut 6) even though they still localized in the nucleoplasm and/or nucleoli (Figure 2.4C, 2.5, and 2.6). These results suggest that some of the amino acids that compose the NLS/NoLS are part of the RBD that mediates the binding of Rev to the RRE of the

viral transcripts before their transport to the cytoplasm where they are translated. Finally, it has been suggested that the nucleolus plays a critical role in the nuclear export of HIV-1 Rev (Daelemans et al., 2004) and that the nucleoli “store” the protein (Kjems et Askjaer, 2000). However, other investigators reported that HIV-1 Rev as well as HTLV-1 Rex exerts nuclear export activity with no nucleolar accumulation (McDonald, Hope et Parslow, 1992). A similar finding was observed here with the Mut 3 mutant that showed nuclear export activity like that of the Rev WT with no localization in the nucleoli (Figure 2.6). The significance of this observation for the BIV life cycle has yet to be determined.

In conclusion, we demonstrated that the nucleolar and nuclear localizations of BIV Rev are mediated via novel NLS and NoLS motifs. BIV Rev NLS and NoLS may help in further understanding the dynamic network of proteins found in the nucleus and nucleoli.

2.6 ACKNOWLEDGEMENTS

A. Gomez Corredor was supported by a graduate studentship from “La Fondation UQAM”. This work was supported by an operating Discovery grant from the National Sciences and Engineering Research Council of Canada to D. Archambault. The authors are grateful to Benoît Barbeau and Daniel Martineau for reviewing the manuscript and helpful discussions.

CHAPITRE III

THE BOVINE IMMUNODEFICIENCY VIRUS REV PROTEIN: IDENTIFICATION OF NOVEL NUCLEAR IMPORT PATHWAY AND NUCLEAR EXPORT SIGNAL AMONG RETROVIRAL REV/REV-LIKE PROTEINS

Andrea Gomez Corredor, Denis Archambault

Département des Sciences Biologiques,

Université du Québec à Montréal, Québec, Canada.

Ce chapitre présenté sous forme d'article scientifique, va a être soumis pour publication dans la revue « *Journal of Virology* ». La conception et la réalisation des expériences ont été faites par l'auteur de cette thèse (Andrea Gomez Corredor). La rédaction du manuscrit ainsi que le montage des figures ont été réalisées par l'auteur de cette thèse. Le professeur Denis Archambault, a contribué de manière importante à la réalisation de cette étude en apportant son expertise scientifique avisée et ses commentaires judicieux, ainsi que le support financier. Pour des raisons écologiques et d'économie de papier, les références de cet article se retrouvent à la fin du manuscrit.

3.1 ABSTRACT

The Rev protein is essential for the replication of lentiviruses. Rev is a shuttling protein that transports unspliced and partially spliced lentiviral RNAs from the nucleus to the cytoplasm via the nucleopore. To transport these RNAs, the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) Rev uses the karyopherin β family importin β and CRM1 proteins that interact with the Rev nuclear localization (NLS) and exportation (NES) signals, respectively. Recently, we reported the presence of new types of bipartite NLS and nucleolar localisation signal (NoLS) in the bovine immunodeficiency virus (BIV) Rev protein. Here we report the characterization of the nuclear import and export pathways of BIV Rev. By using an *in vitro* nuclear import assay, we showed that BIV Rev is transported into the nucleus by a cytosolic- and energy-dependent importin α/β classical pathway. Glutathione *S*-transferase (GST)-pull down experiments confirmed that importins $\alpha 3$ and $\alpha 5$ are involved in this nuclear import process. We also identified a leptomycin B sensitive NES in BIV Rev indicating that the protein is exported via CRM1 like HIV-1 Rev. Mutagenesis experiments showed that the BIV Rev NES maps between amino acids 109 to 121 of the protein. Remarkably, the BIV Rev NES was found to be of the cAMP-dependent protein kinase inhibitor (PKI)-type instead of the HIV-1 Rev-type. In summary, our data showed that the nuclear import and export mechanisms of BIV Rev are novel among Rev proteins characterized so far in lentiviruses.

3.2 INTRODUCTION

Several cell proteins shuttle between the cytoplasm and nucleus to ensure their functions. Macromolecules greater than 40-50 kDa are generally transported through an active mechanism from the cytoplasm to the nucleus across the nuclear envelope through nuclear pore complexes (NPC). This mode of transportation is dependent of soluble factors that also shuttle between the cell cytoplasm and nucleus (Cook et al., 2007; Stewart, 2007). However, proteins with a molecular weight between 20-40 kDa which contain a nuclear localization signal (NLS) are also transported through the NPC (Gorlich et Mattaj, 1996; He, Weber et Levens, 2000). The majority of nucleocytoplasmic factors involved in the nuclear transport belong to the well-characterized family of karyopherins β proteins (Cook et al., 2007; Lott et al., 2010). Karyopherins β involved in the nuclear import are known as “importins”, while karyopherins β involved in nuclear export are known as “exportins” (Cook et al., 2007; Stewart, 2007). The nuclear protein import cycle can be divided into four steps: assembly of the cargo:carrier import complex in the cytoplasm, translocation of the import complex through the NPC, disassembly of import complex in the nucleus and transport of importins back to the cytoplasm (Stewart, 2007).

Several nuclear import pathways for proteins have been described: 1- the classical nuclear import pathway; 2- the pathway involving the direct binding of the cargo to importin β ; and 3- the transportin-dependent nuclear import pathway. Transportin belongs to the karyopherin β proteins and recognizes a NLS different from the traditional mono or bipartite NLSs in the cargo (Cook et al., 2007). In the classical nuclear import pathway, importin α recognizes NLSs (mono or bipartite) within the import cargo proteins, and serves as an adaptor that links the cargo and importin β . The cargo:importin α :importin β complex crosses the nucleopore by the interaction of importin β with the dock proteins or nucleoporins that form the NPC. In the nucleus,

RanGTP makes a complex with importin β allowing the release of the cargo from the import complex. The importin β -RanGTP is then recycled back to the cytoplasm, whereas importin α forms a complex with “Cellular Apoptosis Susceptibility” (CAS) and RanGTP proteins prior to exportation of the complex to the cytoplasm. In the cytoplasm, RanGTP becomes RanGDP via the Ran GTPase activating protein, allowing the dissociation of the complex and release of the importins for a new import cycle (Cook et al., 2007; Stewart, 2007).

As mentioned above, the nuclear export of proteins is regulated by karyopherin β proteins. CRM1 or exportin 1 is a major nuclear export receptor which allows the export of proteins containing a leucine-rich nuclear export signal (NES) (Fornerod et al., 1997; Ossareh-Nazari, Bachelierie et Dargemont, 1997). The leucine-rich NESs were first identified in the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) Rev protein (Fischer et al., 1995) and the cAMP-dependent protein kinase inhibitor (PKI) (Wen et al., 1995) with the consensus sequence motif ϕ -X₂₋₃- ϕ -X₂₋₃- ϕ -X- ϕ (where ϕ is L, I, V, F or M, and x refers to any aa) (Kutay et al., 1997). The CRM1 export process also depends on RanGTP-GDP cycle as for the importins (Fornerod et al., 1997; Kutay et al., 1997; Ossareh-Nazari, Bachelierie et Dargemont, 1997; Stade et al., 1997) and the interaction between a NES and CRM1 can be inhibited by the antifungal antibiotic Leptomycin B (Fornerod et al., 1997; Kudo et al., 1999). More recently, crystallographic studies have shown the conformational changes and the direct interaction between CRM1, HIV-1 Rev NES and RanGTP (Dong et al., 2009; Monecke et al., 2009; Koyama et Matsuura, 2010).

Bovine immunodeficiency virus (BIV) is a lentivirus of the *Retroviridae* family, which shares morphological, genetic, antigenic and/or biological properties with human immunodeficiency virus (HIV) type 1 and other animal lentiviruses, including equine infectious anemia virus (EIAV) (Gonda et al., 1987; Corredor, St-Louis et Archambault, 2010). The BIV provirus DNA is 8,960 nucleotides (nt) in length with a

typical retroviral genomic structure containing the *gag*, *pol* and *env* genes flanked by long terminal repeats (LTRs) at the 5' and 3' termini (Gonda et al., 1994; Corredor, St-Louis et Archambault, 2010). In proximity to the *pol/env* junction, the BIV genome contains additional open reading frames (Orfs) that may encode non-structural regulatory/accessory proteins including the Rev protein (Gonda et al., 1994; Corredor, St-Louis et Archambault, 2010). BIV Rev is a 23 kDa [186 amino acids (aa) in length] phosphoprotein produced from a multi-spliced mRNA that contains an untranslated leader (exon 1) and two encoding exons (exons 2 and 3) (Oberste, Greenwood et Gonda, 1991). As reported for HIV-1 Rev, BIV Rev mediates the nuclear exportation of partially spliced viral RNAs encoding structural proteins, and of unspliced RNAs that serve as genomic RNA by interacting with a stem-loop structure termed Rev responsive element (RRE) present in these RNAs (Pollard et Malim, 1998). The lentiviral Rev protein contains at least three central functional domains: a basic arginine-rich domain that mediates RNA binding (RBD) and that contains the nuclear/nucleolar localization signals (NLS/NoLS), a multimerization domain and a leucine-rich domain that is necessary for the nuclear exportation of Rev (Pollard et Malim, 1998; Narayan et al., 2003).

To fulfill its function, HIV-1 Rev shuttles between the nucleus and the cytoplasm of infected cells via the importin/exportin proteins or the nucleoporin pathway (Pollard et Malim, 1998). The shuttling of HIV-1 Rev into the nucleus is mediated by the direct binding of Rev NLS to the nuclear transport receptors, mainly importin β but also transportin, importin 5 and importin 7 (Arnold et al., 2006). Recent studies showed that HIV-1 Rev is imported *in vivo* to the nucleus by importin β and transportin import pathways, the latter pathway depending on the nucleoporin Nup358 that acts as a dock station (Hutten et al., 2009; Gu et al., 2011). Finally, as mentioned above, HIV-1 Rev is exported from the nucleus to the cytoplasm via the CRM1 pathway (Fischer et al., 1995).

We recently characterized the NLS and NoLS of the BIV Rev protein (Gomez Corredor et Archambault, 2009). We found that BIV Rev is the first Rev/Rev-like protein in complex retroviruses harbouring a bipartite NLS instead of a monopartite NLS (Cochrane, Perkins et Rosen, 1990; Pollard et Malim, 1998; Yang et al., 1999; Narayan et al., 2003; Indik et al., 2005; Lee et al., 2006). In addition, we identified the BIV Rev NoLS, which differs in terms of consensus motif not only from those reported for other NoLSs in Rev and Rev-like proteins but also from those reported in any viral and cellular proteins. We also found that the BIV Rev NoLS is independent of NLS function (Gomez Corredor et Archambault, 2009), a characteristic that differs from the other retroviral Rev/Rev-like proteins (Kubota et al., 1989; Nosaka et al., 1989; Cochrane, Perkins et Rosen, 1990).

Here, we report the characterization of the nuclear import and export pathways of BIV Rev. On one hand we showed that BIV Rev is transported into the nucleus via an active transport dependent of Ran protein and mediated by the classical nuclear import pathway. This mechanism differs from importin β direct import of HIV-1 Rev. We also found, by using an *in vitro* nuclear import and glutathione *S*-transferase (GST)-pull down assays, that two isoforms of importin α , importins $\alpha 3$ and $\alpha 5$, can mediate the transport of BIV Rev to the nucleus. On the other hand, we showed that BIV Rev is exported from the nucleus via the CRM1 pathway like HIV-1 Rev. However, mapping studies using a series of single point mutations showed that aa sequence motif of BIV Rev NES differ from that of HIV-1 Rev NES.

3.3 MATERIALS AND METHODS

3.3.1 Cell cultures and transfections

HEK 293T and HeLa cells were maintained at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Invitrogen, Carlsbad,

CA) supplemented with 10% fetal bovine serum (PAA Laboratories, Inc., Etobicoke, Ontario). For cell transfections, the cells were plated to a cell density of ~50% confluence in 6-well cell culture plates. The next day, plasmids were mixed with the FuGENE HD transfection reagent (Roche, Indianapolis, IN) and added to the cells according to the manufacturer's protocol.

3.3.2 Plasmids and plasmid constructs

Plasmid pRed-C1 Nucleolin encoding for nucleolin in fusion with the red fluorescence protein and plasmid pDM138-based BIV Rev CAT reporter have been described (Gómez Corredor et Archambault, 2009). Plasmid pGEX4T1 encoding the GST protein was purchased from Pharmacia Biotech (Piscataway, NJ). Plasmids pGEX-3X encoding GST-importins $\alpha 1$ - and β were kindly provided by Dr. Dongwan Yoo (University of Illinois at Urbana-Champaign, USA) (Mohammadi et al., 2009). Plasmids coding for GST-importins $\alpha 3$ and $\alpha 5$ were a generous gift of Dr. Javier DiNoia (Montreal Clinical Research Institute, Canada) (Patenaude et al., 2009). Plasmids pQE80-Ran and pQE80-RanQ69L encoding His₆-Ran and mutant His₆-RanQ69 proteins, respectively, were kindly provided by Dr. Virginie Gauthier (University College Dublin, Ireland) (Tsuji et al., 2007). Plasmid pQE70 coding for His₆-importin $\alpha 1$ Δ IBB was a kind gift of Dr. Hoyun Lee (University of Ottawa, Canada) (Kim et Lee, 2008).

To generate bacteria-expressed proteins in fusion with enhanced green fluorescent protein (EGFP), the EGFP sequence was first amplified by PCR from the pEGFP-C1 vector (Clontech, Palo Alto, CA) with primers that introduced 5' NheI and 3' EcoRI restriction sites. The PCR product was digested with NheI and EcoRI and subsequently cloned into the corresponding restriction sites in the pET21b+ vector (Novagen, Madison, WI) which introduces a six histidine (His₆) tag at the C-terminale of the protein. The plasmid construct encoding EGFP was validated by

DNA sequencing through the McGill University Sequencing Services (Montréal, Québec, Canada) and designated pET-EGFP. To generate BIV Rev proteins in fusion with EGFP (at the N-terminal of Rev) and the His₆ tag (at the C-terminal of Rev), BIV and HIV-1 Rev-encoding wild type (WT) sequences were amplified by PCR from pEGFP-BIVRevWT (Gomez Corredor et Archambault, 2009) and pCMV-HIV-1Rev (a gift from Dr. Benoît Barbeau, University de Québec à Montréal, Canada), respectively, by using primers that introduced 5' EcoRI and 3' XhoI restriction sites. Digested PCR products were then cloned into pET-EGFP. To generate a version of BIV Rev-His without EGFP, the BIV Rev WT-encoding sequence was cloned into 5' EcoRI and 3' XhoI restriction sites of pET21b+. All resulting plasmid constructs encoding BIV EGFP Rev-His, HIV-1 EGFP Rev-His and BIV Rev-His proteins were sequenced for validation.

To generate EGFP-BIVNES fusion protein for eukaryotic expression, two complementary primers (5'- CCC TTG AGG ATC TTG TTC GCC ACA TGT CGC TGG-3' and 5'-GAT CCC AGC GAC ATG TGG CGA ACA AGA TCC TCA AGG GGG CC-3') containing the sequence encoding the putative 10 aa BIV Rev NES were inserted into the ApaI/BamHI sites of pEGFP-C1 to generate pEGFP-BIVNES. The plasmid construct was then validated by sequencing.

3.3.3 Site-directed mutagenesis

To identify the aa residues that compose the BIV Rev NES, a series of site-directed alanine substitution mutants targeting selected residues present in the 10 aa BIV NES putative sequence was generated from the full length BIV Rev WT sequence. Complementary sense and antisense primers were designed to contain the desire mutation(s) flanked by 8 to 10 nucleotides (nt) with unmodified sequence (sequences available upon request). The resulting mutated sequences were cloned into the NotI/ApaI sites of pcDNA3.1Myc/His expression vector (Invitrogen) to generate

plasmids encoding BIV Rev-Myc/His mutant proteins (see Figure 3.7). All mutant constructs were validated by sequencing.

3.3.4 Purification and labeling of recombinant proteins

BIV Rev-His, BIV EGFP Rev-His and HIV-1 EGFP Rev-His proteins were expressed in Rosetta-gamiTM B (DE3)pLysS cells (Novagen) upon induction with 1 mM isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) for 4 h at 37°C. His₆-Ran, His₆-RanQ69L and His₆-Importin α 1- Δ IBB proteins were expressed in M15[pREP4] cells (Qiagen, Valencia, CA) upon induction with 1 mM IPTG overnight at 30°C. Bacterial cells were pelleted, frozen at -80°C, thawed and then resuspended in extraction buffer [0.5% NP40, 0.5% Triton X-100 in phosphate buffered saline (PBS, pH 7.3) solution] supplemented with the protease inhibitor cocktail (Roche). Cells were lysed by addition of 1 mg/ml of lysozyme and 2.5 U of benzonase (Novagen) for 20 min on ice. After sonication, cell lysates were cleared by centrifugation at 20,000 x g at 4°C for 30 min. Supernatants were incubated with Ni-NTA His•Bind® Resin (Novagen) for 2 h at 4°C. After three washes with extraction buffer, bound proteins were eluted with elution buffer (300 mM imidazole and 300 mM NaCl) supplemented with the protease inhibitor cocktail.

GST and GST-importins α 1, α 3, α 5, and β fusion proteins were expressed in Rosetta-gamiTM B (DE3)pLysS cells upon induction with 0.5 mM IPTG 4 h at 37°C for the GST alone and overnight at 30°C for GST-importins fusion proteins. Bacterial cells were processed as described above with the exception that the extraction buffer was 1% Triton X-100 in PBS pH 7.3. The cell lysates were then incubated with GST•Bind® Resin (Novagen) for 2 h at 4°C. After three washes with extraction buffer, bound proteins were eluted with elution buffer (100 mM glutathione, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1% Triton X-100 and 300 mM NaCl) supplemented with the protease inhibitor cocktail. Purified GST protein was labeled with fluorescein

isothiocyanate (FITC; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) according to the manufacturer's protocol and was designated GST-FITC hereafter. Rhodamine-labeled bovine serum albumin coupled to a peptide containing the NLS of the SV40 T antigen (BSA-NLS_{SV40}) was purchased from Sigma-Aldrich.

Where indicated, all purified proteins described above were dialyzed against the transport buffer (20 mM HEPES-KOH, pH 7.4, 110 mM KOAc, 2 mM Mg(OAc)₂, 0.5 mM EGTA, 2 mM DTT, and protease inhibitors), and stored at -80°C for further use.

3.3.5 *In vitro* nuclear import assay

The *in vitro* nuclear import assay was performed as described (Adam, Marr et Gerace, 1990; Kehlenbach Ralph H, 2006; Cassany et Gerace, 2009) with some modifications. HeLa cells were seeded on coverslips in 12-well cell culture plates and grown up to 70% confluence. Cells were washed twice with ice-cold transport buffer and permeabilized with digitonin (25 µg/ml) for 5 min on ice. The optimal digitonin concentration for cell permeabilization was determined as described (Kehlenbach Ralph H, 2006). Following permeabilization, cells were washed five times with ice-cold transport buffer. The standard import reaction mixtures contain an ATP regeneration system (1 mM ATP and GTP, 5 mM phosphocreatine and 20 U/ml of creatine phosphokinase) as a source of energy, rabbit reticulocyte lysate (RRL) (25 µl) (Promega, Madison WI) as a source of soluble import factors, unlabeled BSA (5 mg/ml) and 2 µM of substrate import (BIV EGFP Rev-His, HIV-1 EGFP Rev-His, GST-FITC or BSA-NLS_{SV40}) in a final volume of 50 µl of transport buffer. When purified recombinant importins were used, no RRL was added and 2 µM of specified importin was used with 2 µM of Ran or RanQ69L as indicated. The import reactions were performed for 30 min at 37°C or 4°C. Cells were then washed twice with transport buffer and fixed with formaldehyde 3.5%. Nuclei were counterstained with

4-,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Sigma-Aldrich). The coverslips were then mounted on glass slides using ProLong® Gold Antifade Reagent (Invitrogen) for fluorescence analysis. Where indicated, digitonin-permeabilized HeLa cells were pre-incubated prior to the import assay as follow: for wheat germ agglutinin (WGA; Sigma-Aldrich) treatment, coverslips were incubated for 30 min at room temperature with transport buffer containing 0.8 mg/ml of WGA; for apyrase (Sigma-Aldrich) treatment, coverslips were incubated for 15 min at 4°C with transport buffer containing 25 U/ml of apyrase.

3.3.6 Leptomycin B treatment

Cells cultured on coverslips in 6-well cell culture plates were transfected with each of the respective pEGFP and pcDNA3.1Myc/His expression constructs. At 24 h posttransfection, cells were left untreated or treated with leptomycin B (LMB; Sigma-Aldrich) at a final concentration of 5 nM in the appropriate growth medium. After an incubation time of 4 h, the cells were fixed for nuclei staining and mounted as described above for nuclear import assay.

3.3.7 Fluorescence microscopy

The fluorescence images were taken with an Eclipse Ti fluorescent microscope (Nikon) equipped with a 40× 0.75 numerical aperture objective lens. Images were captured as 8-bit TIFF files with a Scion CFW-1608C camera. All images were analyzed with the Image-J software (Rasband, 1997-2004b).

For analysis of import efficiencies in presence of recombinant receptors, the intensity of fluorescence (pixel units) was measured within nuclei and cytoplasm (Iosef et al., 2008). The pixel intensity was averaged for 75 to 100 cells in triplicate for each subcellular region. All values were corrected for background fluorescence. The results were expressed as the ratio of nuclear to cytoplasmic fluorescence (Fn/c).

P statistical values were obtained by performing a two-tailed *t*-test and using a Welch's correction when the variances were not equal.

For experiments performed with transfected cells, images were taken as described above. For each protein examined, 50 positive cells were observed. The data shown below were representative from three independent experiments of expression patterns observed in > 70% of the cells.

3.3.8 Indirect immunofluorescence assay

HEK 293 cells cultured on coverslips in 6-well cell culture plates were transfected with the respective expression vectors. After an incubation of 48 h, the transfected cells were fixed with 4% paraformaldehyde in PBS for 15 min, permeabilized with 0.2% Triton X-100 for 10 min, blocked with 4 % bovine serum albumin in PBS for 1 h at 37°C, and then incubated with mouse primary anti-Myc antibodies (1 µg/ml, Roche) for 1 h at 37°C. After three washes with PBS containing 0.2% Triton X-100, the cells were incubated with Alexa 488 anti-mouse secondary antibodies (Invitrogen) for 1 h at 37°C. Nuclei were counterstained with DAPI. The coverslips were then mounted on glass slides using ProLong® Gold Antifade Reagent (Invitrogen).

3.3.9 Chloramphenicol acetyltransferase (CAT) assay

BIV Rev nuclear export activity was quantified in transient transfection assays using a pDM138-based BIV Rev CAT reporter construct as previously described (Gomez Corredor et Archambault, 2009). Briefly, HEK 293T cells were seeded in 12-well cell culture plates, and then co-transfected the next day with 0.5 µg of empty pcDNA3.1Myc/His or each of the pcDNA3.1Myc/His constructs encoding either BIV Rev WT (Gomez Corredor et Archambault, 2009) or each of the Rev mutants, 0.5 µg of pRRE-BIV and 0.2 µg of RSV-β-galactosidase plasmid (Fisher Scientific, Nepean,

Ontario). The RSV- β -galactosidase plasmid was used as a control for transfection efficiency and data normalization. Cells were harvested at 48 h following transfection, and lysed with the lysis buffer (CAT-ELISA kit; Roche). The amount of CAT in 50 μ g of total cellular proteins was determined using the CAT-ELISA kit. β -galactosidase activity of each cell extract was determined as previously described (Gomez Corredor et Archambault, 2009). CAT expression data were normalized through the establishment of a ratio using β -galactosidase activity for each sample. Rev activity was defined as the ratio of CAT quantity obtained in cells transfected with the plasmids containing BIV RRE and Rev WT- or Rev mutant-encoding protein that obtained by cells transfected with the BIV RRE-containing plasmid alone. All cell transfections were performed in triplicate and the experiments were repeated three times. Statistical analysis was performed using a two-tailed *t*-test.

3.3.10 SDS-PAGE and Western blot analyses

Cell extracts were prepared as described previously (Gómez Corredor et Archambault, 2009). Total cell protein concentrations were quantified with the DC protein assay (Bio-Rad). For each sample, 50 μ g of total cell extract was electrophoretically separated onto 12 or 15% SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membranes. The membranes were blocked in PBS containing 0.05% Tween-20 (PBS-T) in presence of 5% nonfat dry milk powder for 1 h at room temperature. The membranes were incubated for 1 h at room temperature with mouse monoclonal primary antibodies specific to either GFP (Roche), His₆ tag (Qiagen) or Myc tag (Roche) or tubulin α (Sigma-Aldrich). Following incubation with the antibodies, membranes were washed three times with PBS-T and then incubated for 1 h at room temperature with anti-mouse horseradish peroxidase-conjugated IgGs (Bethyl, Montgomery, TX) used as secondary antibodies. The signal was detected by enhanced chemiluminescence (ECL) (Perkin Elmer, Boston, MA). The membranes were then exposed to Kodak Biomax Light-1 films.

3.3.11 GST pull-down assay

Binding studies were realized as previously described (Hutten et al., 2009). Briefly, GST-importin recombinant fusion proteins (5 µg) were immobilized on 40 µl of slurry GST•Bind® Resin which was pre-incubated with 10 mg/ml BSA. A total of 5 µg of BIV Rev-His in 500 µl of binding buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 200 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 5% glycerol, 2 mg/ml BSA) was added to each reaction. After 2 h of incubation at 4°C, the beads were washed four times with binding buffer. Bound proteins were eluted with SDS-sample buffer, subjected to 12% SDS-PAGE and visualized by Western blot with the anti-His₆ tag antibody (Qiagen).

3.4 RESULTS

3.4.1 Nuclear import of BIV Rev is dependent on cytosolic factors and the nucleopore

We previously reported that BIV Rev has a bipartite NLS necessary for nuclear localization of the protein (Gomez Corredor et Archambault, 2009). To investigate the mechanism by which BIV Rev is transported into the nucleus, an *in vitro* nuclear import assay using digitonine-permeabilized HeLa cells was carried out. The import substrate used in this assay was BIV EGFP Rev-His fusion protein with a predicted molecular weight of 50 kDa. Thus BIV EGFP Rev-His is not expected to enter into the nucleus by passive diffusion as proteins with molecular weights greater than ~40 kDa are transported into the nucleus across the NPC by an active and receptor-mediated mechanism (Cook et al., 2007; Stewart, 2007). As a positive control of active and receptor-mediated transport, the BSA-NLS_{SV40} peptide with a molecular mass of 100 kDa was used (Kehlenbach Ralph H, 2006). As expected, when the complete system assay containing cytosol (e.g. with RRL and energy) was used at 37°C, BIV EGFP Rev-His and BSA-NLS_{SV40} proteins were completely translocated into the nucleus as indicated in the merge panels of Figure 3.1. In contrast, both

proteins localized exclusively in the cytoplasm when the buffer solution with no cytosol was added in the assay, indicating that the nuclear transport of BIV EGFP Rev-His is dependent of cytosolic factors. To determine whether nuclear transport of BIV EGFP Rev-His is mediated by an active transport, we performed a complete import assay (with RRL and energy) at 4°C. This temperature is recognized to inhibit active nuclear transport with no harm on passive diffusion of a molecule (Talcott et Moore, 1999). As shown in Figure 3.1, nuclear transport of BIV EGFP Rev-His and BSA-NLS_{SV40} was completely inhibited at 4°C. A similar result was obtained when the nuclear import assay was realized in presence of WGA, a potent inhibitor of active nuclear import of molecules (Mohr et al., 2009). Taken together, the data indicate that the nuclear import of BIV EGFP Rev-His is dependent of cytosolic factors, and is carried out actively through the NPC.

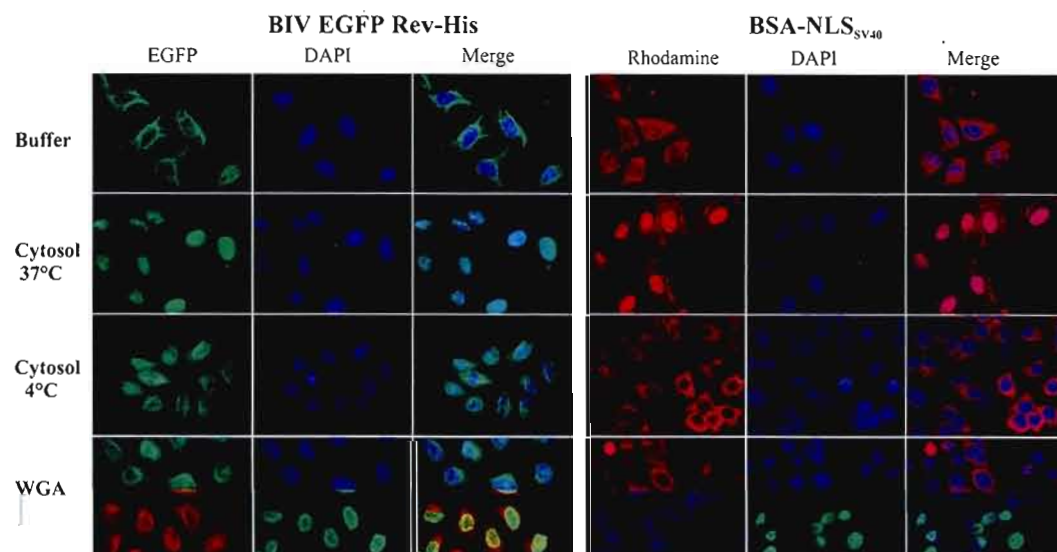


Figure 3.1. Nuclear import of BIV Rev in HeLa cells is an active transport dependent of cytosolic factors and the nucleopore. The nuclear import of BIV EGFP Rev-His and rhodamine-conjugated BSA-NLS_{sv40} was examined by using an *in vitro* nuclear import assay. Digitonin-permeabilized HeLa cells were incubated at 4 or 37°C with 2 µM of BIV EGFP Rev-His or BSA-NLS_{sv40} in 50 µl of transport buffer alone or complete transport buffer containing an ATP regeneration system and rabbit

reticulocyte lysate (identified as cytosol in the figure). For WGA treatment, permeabilized cells were pre-incubated with 0.8 mg/ml of WGA for 30 min at room temperature and incubated for 30 min at 37°C with complete transport buffer. Cells were washed with transport buffer and then fixed and stained with DAPI. Cells were visualized by fluorescence microscopy.

3.4.2 ATP and Ran protein are required for the nuclear importation of BIV Rev

Several proteins with a NLS are able to enter into the nucleus by a mechanism different from NPC-, carrier- and energy-dependent import pathways e.g. classical, importin β or transportin pathways (Vazquez-Iglesias et al., 2009). To determine the energy requirements for BIV Rev nuclear import, we performed the nuclear import assay with a mixture of cytosol depleted of the ATP regeneration system. As shown in Figure 3.2A, depletion of the energy source (– ATP panel) did not affect the nuclear import of BIV EGFP Rev-His and BSA-NLS_{SV40} observed in presence of ATP (+ ATP panel). Since nuclear import of BSA-NLS_{SV40} in digitonin-permeabilized HeLa cells is importin and energy-dependent (Adam, Marr et Gerace, 1990; Tsuji et al., 2007), residual ATP present after cell permeabilization might have supported the nuclear import observed above in absence of ATP. Therefore, the nuclear import assay was performed in permeabilized cells pre-incubated with apyrase, an enzyme that is able to eliminate free ATP and GTP (Garcia-Bustos, Wagner et Hall, 1991; Moore et Blobel, 1992). Apyrase treatment disrupted nuclear import of both BSA-NLS_{SV40} and BIV EGFP Rev-His (Figure 3.2A, +Apyrase panel), confirming that the nuclear import of BIV EGFP Rev is energy-dependent.

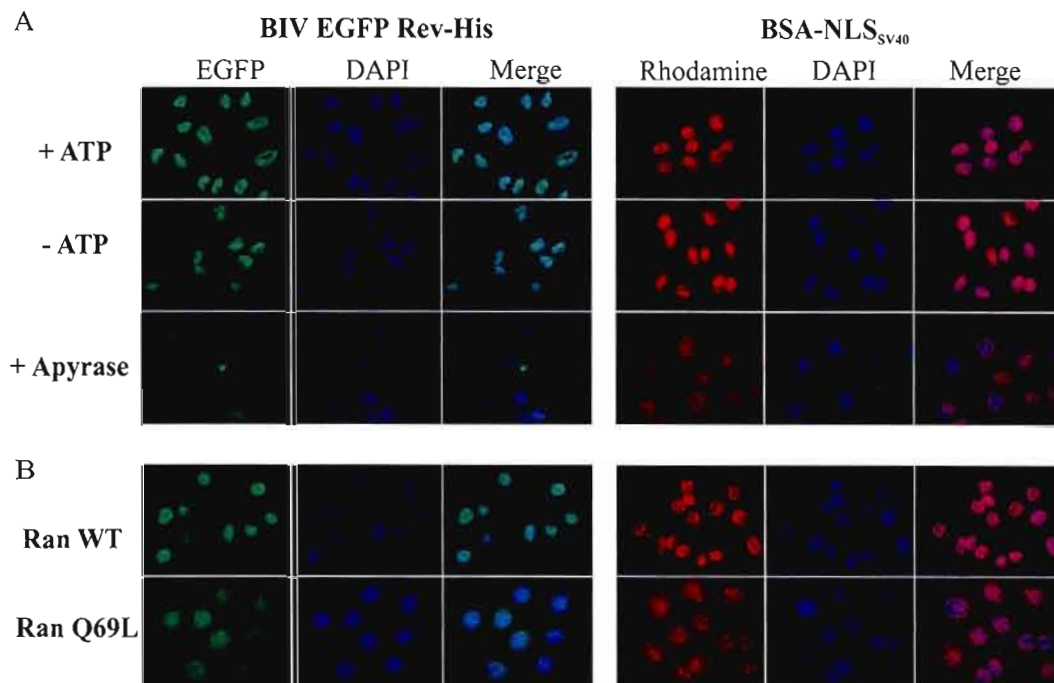


Figure 3.2. Nuclear import of BIV Rev in HeLa cells is dependent of energy and Ran protein. (A) Digitonin-permeabilized HeLa cells were incubated at 37°C with 2 μ M of either BIV EGFP Rev-His or BSA-NLS_{sv40} in 50 μ l of transport buffer containing rabbit reticulocyte lysate in presence (complete transport buffer) or absence of ATP regeneration system. For the apyrase experiment, cells were pre-incubated with buffer containing 25 U/ml of apyrase for 15 min at 37°C and then incubated with complete transport buffer. (B) Digitonin-permeabilized HeLa cells were incubated with 2 μ M of BIV EGFP Rev-His or BSA-NLS_{sv40} in 50 μ l of complete transport buffer in presence of 2 μ M of either Ran or RanQ69L. Cells were washed with transport buffer and then fixed and stained with DAPI. Cells were visualized by fluorescence microscopy.

Hydrolysis of Ran GTP by Ran GTPase is essential for nuclear import of proteins. Ran GTP releases the import complex from high affinity binding sites in NPC and unloads import cargo into the nucleus. Once in the nucleus, Ran GTP complexes with importin β , and then the complex is exported to the cytoplasm. There, Ran GTP becomes Ran GDP which is imported in the nucleus by nuclear transport factor 2 (NFT2) for another Ran cycle (Stewart, 2007). To determine whether the nuclear transport of BIV Rev is dependent of Ran, the nuclear import assay was carried out in

presence of the wild-type form of Ran (Ran WT) and of RanQ69L. RanQ69L is a mutant GTP form of Ran which cannot be converted to the GDP form (Klebe et al., 1995) but is still able to promote the disassembly of nuclear import complexes (Rexach et Blobel, 1995). As shown in Figure 3.2B, RanQ69L was able to inhibit, at least partly, the nuclear import of both BSA-NLS_{SV40} and BIV EGFP Rev-His, in contrast to the positive nuclear import of the proteins in presence of Ran WT. These results showed that BIV Rev is specifically imported into the nucleus *in vitro* by a mechanism that appears to be dependent of importin β .

3.4.3 BIV Rev nuclear import does not rely on direct binding importin β pathway

HIV-1 Rev is the only retroviral Rev/Rev-like protein for which the mechanism of nuclear import has been elucidated (Henderson et Percipalle, 1997; Truant et Cullen, 1999; Arnold et al., 2006; Hutten et al., 2009). HIV-1 Rev is transported into the nucleus through its direct binding to several import receptors, mainly importin β , but also importin 5, importin 7, importin 9 or transportin (Arnold et al., 2006; Hutten et al., 2009). To determine whether the BIV Rev protein is imported into the nucleus through the direct binding with importin β , we conducted a nuclear import assay by using, as a source of cytosolic factors, purified recombinant importin β and Ran WT proteins as previously described (Adam, Marr et Gerace, 1990). GST-FITC protein was used in the assay as a negative control as GST does not contain a NLS and thus cannot be translocated to the nucleus. BSA-NLS_{SV40} was used as a control of the classical nuclear import pathway (Adam, Marr et Gerace, 1990; Tsuji et al., 2007) whereas HIV-1 EGFP Rev-His was used as a positive control of the *in vitro* importin β nuclear import pathway (Henderson et Percipalle, 1997; Truant et Cullen, 1999; Arnold et al., 2006). As shown in Figure 3.3, no GST-FITC, BIV EGFP Rev-His or HIV-1 EGFP Rev-His proteins localized in the nucleus in absence of import mixture (buffer panel) indicating that the nuclear envelope was intact following cell

permeabilization. This result also confirms that soluble factors are needed for BIV Rev to enter the nucleus. As expected, BSA-NLS_{SV40} did not localize in the nucleus when importin β alone was used in the assay.

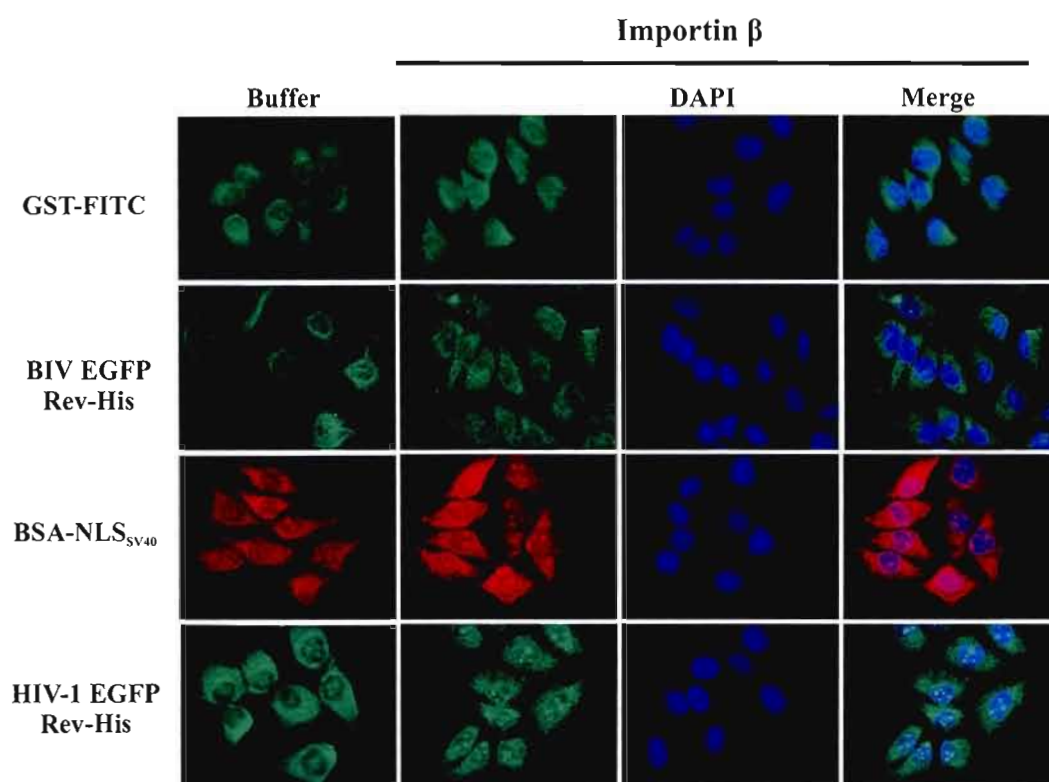


Figure 3.3 The BIV Rev protein is not imported into the nucleus by importin β alone. Digitonin-permeabilized HeLa cells were incubated with 2 μ M of either GST-FITC, BIV EGFP Rev-His, BSA-NLS_{SV40} or HIV-1 EGFP Rev-His proteins in 50 μ l of transport buffer containing ATP regeneration system, 2 μ M of Ran WT and 2 μ M of GST-importin β . Cells were washed with transport buffer, fixed and stained with DAPI. Cells were visualized by fluorescence microscopy.

A similar result was obtained with BIV EGFP Rev-His which was found predominantly in the cytoplasm with no nuclear accumulation. In contrast, HIV-1 EGFP Rev-His localized into the nucleus and nucleolus although an important background was present in the cytoplasm, an observation reported elsewhere (Hutten

et al., 2009). These results indicated that BIV EGFP Rev-His is not directly imported in the nucleus by importin β alone as for HIV-1 Rev, and that another nuclear import mechanism is involved.

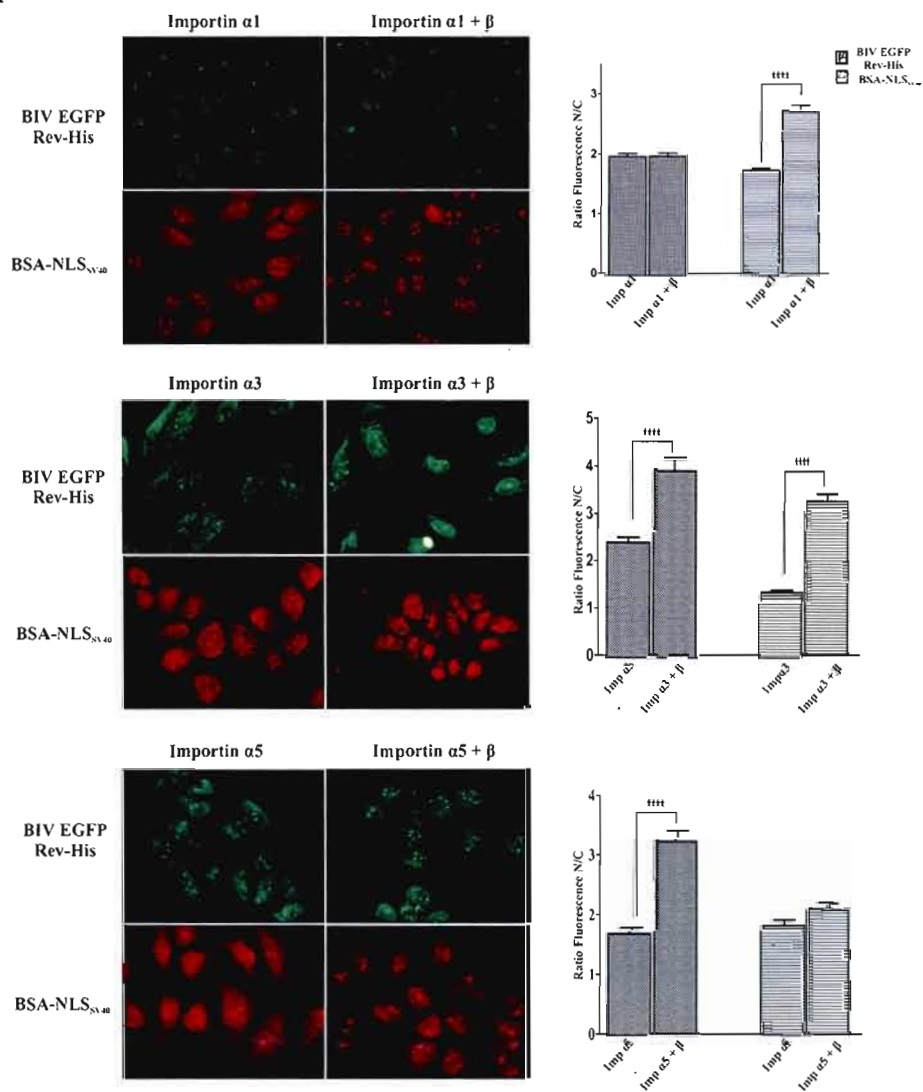
3.4.4 Importins α and β are both required for nuclear import of BIV Rev and importin $\alpha 3$ and $\alpha 5$ isoforms are transport receptors

To investigate whether BIV EGFP Rev-His is imported in the nucleus by the classical nuclear import pathway, we performed a nuclear import assay with exogenous recombinant importin α/β and Ran proteins that were used as cytosol substitute. Moreover, as cellular and viral proteins have been recently shown to enter the nucleus with the involvement of various isoforms of importin α (Bian et al., 2007; Fagerlund et al., 2008; Boivin et Hart, 2011), the nuclear import assay was performed in a more specific means with either importin $\alpha 1$, importin $\alpha 3$ or importin $\alpha 5$ used alone or in combination each with importin β . As found in Figure 3.4A, no difference in the fluorescence intensity in the nucleus versus cytoplasm was observed when importin $\alpha 1$ was used alone or in combination with importin β , thereby indicating that importin $\alpha 1$ is not involved in the nuclear import of BIV EGFP Rev-His. In contrast, BSA-NLS_{SV40} was imported into the nucleus in the context of importin $\alpha 1/\beta$ use. This was shown by the nucleus to cytoplasm fluorescence intensity ratio which was significantly higher with importin $\alpha 1/\beta$ when compared to that observed with importin $\alpha 1$ alone (Figure 3.4A). When importin $\alpha 3$ was used, it was able to import both BIV EGFP Rev-His and BSA-NLS_{SV40} into the nucleus in an importin β -dependent way (Figure 3.4A). In contrast, BIV EGFP Rev-His readily translocated to the nucleus in presence of importin $\alpha 5$ and importin β whereas no nuclear importation was observed with BSA-NLS_{SV40} (Figure 3.4A). Taken together, the results indicate that BIV Rev nuclear import is mediated by the classical import pathway involving importins $\alpha 3$ or $\alpha 5$ each in combination with importin β .

A nuclear protein background was observed when the import nuclear assay was performed with either BIV EGFP Rev-His or BSA-NLS_{SV40} in presence of importin α (either importin $\alpha 1$, $\alpha 3$ or $\alpha 5$) alone. As BSA-NLS_{SV40} is recognized to be transported in the nucleus through the involvement of importin α/β heterodimers (Stewart, 2007), attempts were made to eliminate the background by pre-incubating the permeabilized cells with an antibody against importin β prior to the import assay. This procedure had no effect on the BIV EGFP Rev-His or BSA-NLS_{SV40} nuclear background (data not shown), suggesting that residual importin β was likely present in the cell cytoplasm allowing the nuclear import. To rule out the possibility that the nuclear import of BIV EGFP Rev-His is dependent of importin α only with no involvement of importin β , a situation previously described for other proteins (Kotera et al., 2005; Nitahara-Kasahara et al., 2007), the nuclear import assay was conducted using the Δ IBB mutant form of importin α . Although this importin α mutant form is able to enter the nucleus, it lacks the importin β binding domain (IBB). As a result, it cannot form a heterodimer with importin β and thus is unable to mediate the classical nuclear import pathway (Miyamoto et al., 2002). The use of the importin α Δ IBB mutant resulted in no nuclear import of both BIV EGFP Rev-His and BSA-NLS_{SV40} (data not shown), indicating further that the classical nuclear import pathway is at play for BIV Rev localization in the nucleus.

Results from the nuclear import assay prompted us to conduct a GST pull-down assay using bacterially-expressed recombinant BIV Rev-His and GST-importins $\alpha 1$, $\alpha 3$, $\alpha 5$, and β immobilized on a glutathione resin. As shown from Western blot results (Figure 3.4B), BIV Rev-His interacted with importins $\alpha 3$ and $\alpha 5$ whereas no binding occurred with importin $\alpha 1$ and importin β (Figure 3.4B). These results combined with the nuclear import data unambiguously showed that BIV Rev is imported in the nucleus by the classical import pathway *in vitro* and that both importins $\alpha 3$ and $\alpha 5$ can transport the protein into the nucleus.

A



B

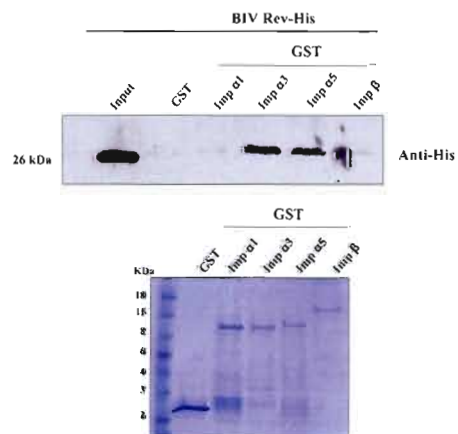


Figure 3.4. The BIV Rev protein is transported into the nucleus by the classical nuclear import pathway involving importins $\alpha 3$ and $\alpha 5$. (A) Nuclear import assay. Left panel: Digitonin-permeabilized HeLa cells were incubated with 2 μ M of either BIV EGFP Rev-His or BSA-NLS_{sv40} in 50 μ l of transport buffer containing ATP regeneration system, 2 μ M of Ran WT, 2 μ M of GST-importin α alone or used in combination with 2 μ M of GST-importin β . Right panel: Import efficiencies of BIV EGFP Rev-His or BSA-NLS_{sv40} in presence of GST-importin α alone or used in combination with importin α/β were quantified by measuring the fluorescence intensity in the nucleus and the cytoplasm. The results were expressed as the mean N/C fluorescence ratio with the standard error about the mean. Values significantly different between importin α and importin α/β conditions using a two-tailed *t* test are indicated by an asterisk ($P < 0.0001$). (B) GST-pull down assay. GST, GST-importin $\alpha 1$, GST-importin $\alpha 3$, GST-importin $\alpha 5$ or GST-importin β were immobilized on beads and incubated with BIV Rev-His. Bound proteins were analyzed by 12% SDS-PAGE followed by Western Blot using an anti-His₆ tag antibody. The bottom part of the figure shows the Coomassie brilliant blue-stained gel to illustrate the purified GST and GST-importin input.

3.4.5 CRM1-specific inhibitor LMB increases BIV Rev nuclear accumulation

All retroviral Rev and Rev-like proteins characterized so far contain CRM1-dependent NESs necessary for nuclear export (Bogerd et al., 1998; Harris et al., 1998; Otero et al., 1998; Kiss et al., 2003). Therefore, we wished to determine whether BIV Rev is also exported via CRM1. To conduct this study, cells were co-transfected with plasmids encoding either the BIV EGFP-Rev which localizes in the nucleus and nucleolus of transfected cells or the mutant BIV EGFP-Rev $\Delta 3$ which localizes in the nucleolus and cytoplasm but not in the nucleus (Gomez Corredor et Archambault, 2009), together with a plasmid encoding the red fluorescence nucleolin fusion protein used as a nucleolar marker. At 24 h post-transfection, cells were either left untreated or incubated with LMB, a potent inhibitor of interaction between NES and CRM1 and, thereof, of the nuclear export of a NES-containing protein (Fornerod et al., 1997; Kudo et al., 1999). As shown in Figure 3.5, LMB blocked the nuclear exportation of BIV EGFP-Rev $\Delta 3$ as the protein was present in the nucleolus/nucleus but not in the cytoplasm of transfected cells. This result was less obvious with the WT form of BIV Rev (BIV EGFP-Rev) which was present in the nucleus and nucleolus regardless of

the LMB treatment. Taken all together, these results are in agreement with our previous report (Gomez Corredor et Archambault, 2009) and confirm that the nuclear export of BIV Rev is CRM1-dependent.

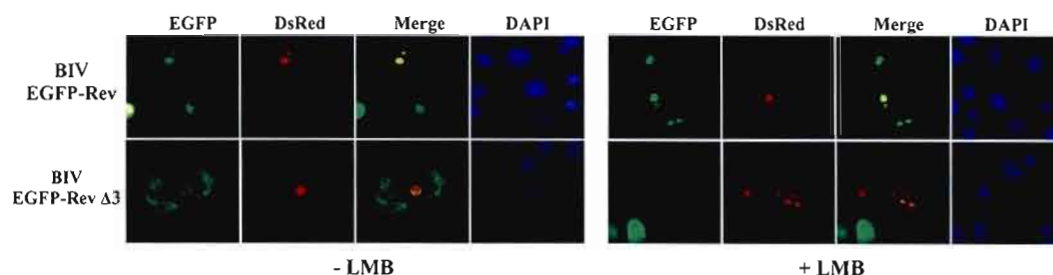


Figure 3.5. The BIV Rev protein nuclear export is CRM1-dependent. HEK 293T cells were co-transfected with pEGFPRevWT or pEGFPRev Δ 3 and the pRed-C1Nucleolin plasmids. After 24 h of transfection, cells were incubated in presence of 5 nM of LMB or left untreated for 4 h. Cells were fixed and the nuclei were counterstained with DAPI for cellular localization of the proteins. Expression of the proteins was detected via the fluorescence of EGFP (in green) or DsRed (in red). The merge image represents the superposition of either BIV EGFP-Rev or BIV EGFP-Rev Δ 3 and DsRed-Nucleolin images. The images shown are representative of the expression patterns (three independent experiments) observed in > 70% of the cells.

3.4.6 The NES of BIV Rev

In order to identify the region required for nuclear exportation of BIV Rev, we used a previously described BIV Rev M6 mutant in fusion with EGFP (Gomez Corredor et Archambault, 2009). BIV Rev M6 has a deletion encompassing aa 111 to 130 of the BIV Rev WT sequence and localizes in the nucleus and nucleolus of transfected cells as for the BIV Rev WT (Figure 3.6A) as previously described (Gomez Corredor et Archambault, 2009). However, it is unable to export RNA from the nucleus to the cytoplasm in contrast to the BIV Rev WT (Figure 3.6B) as determined in a Rev activity assay (Gomez Corredor et Archambault, 2009). This lack of activity may be interpreted as the inability of BIV Rev M6 to bind to the RRE present in the RNA due to the deletion of RBD, or, alternatively, to mediate RNA exportation upon deletion of a putative NES. As the RBD in retroviral Rev and Rev-

like proteins are known to be rich in basic residues (lysine or arginine) (Nosaka et al., 1989; Pollard et al., 1998; Indik et al., 2005), it is unlikely that the RBD could be present in the 111 to 130 aa region deleted in Rev M6 contains only one arginine residue. In contrast, the NetNES 1.1 prediction program (la Cour et al., 2004) identified a putative NES CRM1-dependent signal from aa 112 to 121 in the BIV Rev protein.

To determine whether this predicted region functions as a *bona fide* NES, we directly fused this putative 10 aa NES sequence in the C-terminal end of EGFP (Figure 3.6C). Expression of EGFP and EGFP-BIVNES proteins in transfected HEK 293T cells was confirmed by Western blot analysis (Figure 3.6D). As expected, the EGFP control showed diffuse distribution in both the cytoplasm and the nucleus in absence or presence of LMB, whereas EGFP-BIVNES mainly localized in the cytoplasm of HEK 293T cells in absence of LMB (Figure 3.6E). In contrast, LMB completely blocked the nuclear exportation of EGFP-BIVNES to the cytoplasm. These results clearly indicate that the region encompassing aa 112 to 121 in BIV Rev contains a functional CRM1-dependent NES that exports the protein from nucleus to cytoplasm.

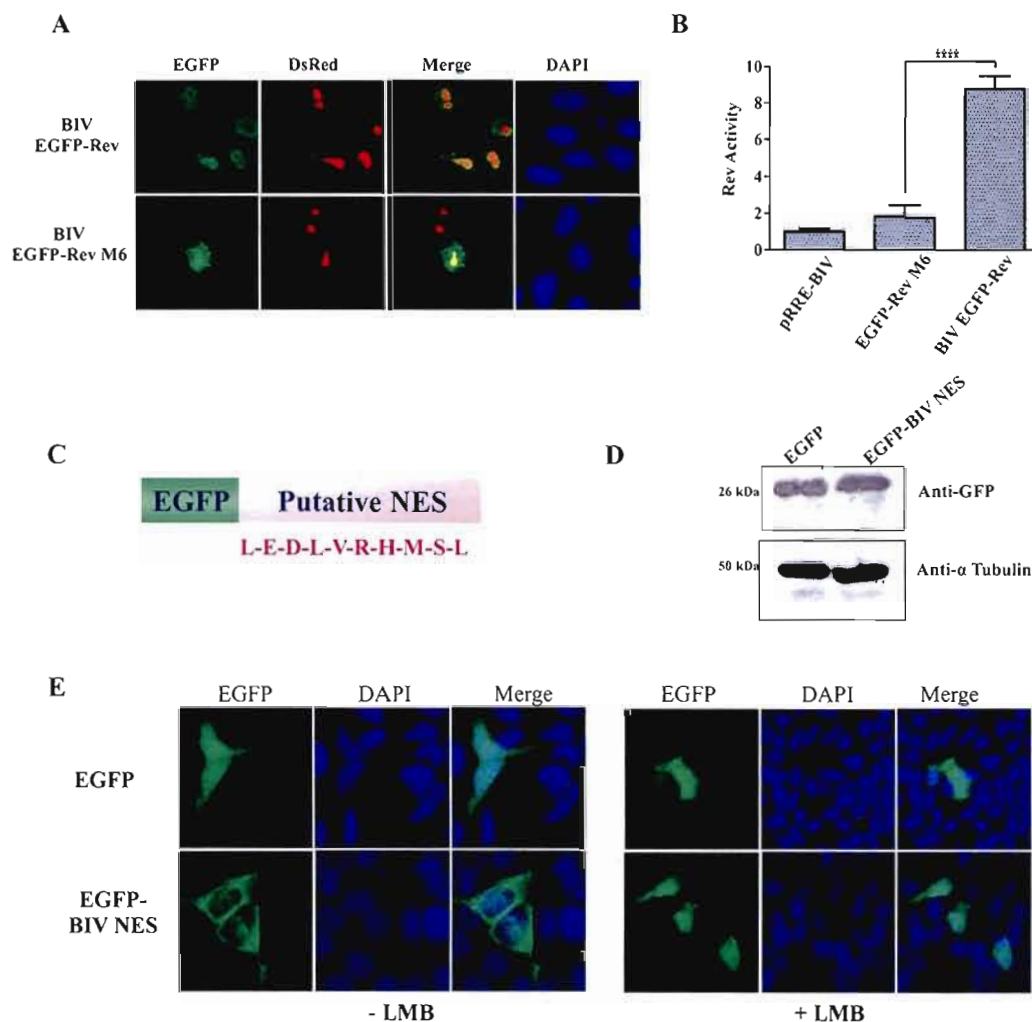


Figure 3.6. The region encompassing amino acids (aa) 111 and 130 of BIV Rev is associated to nuclear export function of the protein. (A) Cellular localization of BIV Rev WT and BIV Rev M6 mutant both in fusion with EGFP. HEK 293T cells were co-transfected with pEGFPRevWT or pEGFPRevM6 in combination with the pRed-C1Nucleolin plasmid. 24 h after transfection, cells were fixed and the nuclei were counterstained with DAPI. The expression of the proteins was detected via the fluorescence of EGFP (in green) or DsRed (in red). The merge image represents the superposition of both EGFP and DsRed images. The images shown are representative of the expression patterns (three independent experiments) observed in > 70% of the cells. (B) The nuclear export activity of EGFP-RevM6 (harboring the 111 to 130 aa deletion within the BIV Rev WT sequence) fusion protein was determined using a CAT gene reporter assay performed with 50 μ g of cell lysate. The CAT levels were normalized to the β -galactosidase activity. The results represent mean values of

triplicate samples of at least three separate experiments. Rev activity is expressed as the mean ratio of BIV EGFP-Rev (Rev WT) or mutant CAT expression versus basal expression of pRRE-BIV alone. Vertical bars indicate the standard error about the mean. ****; value significantly different ($p < 0.0001$) from BIV EGFP-Rev using a two-tailed *t*-test. (C) Bioinformatic analysis of the region deleted in Rev M6 showed that a sequence of 10 aa can harbour the NES. The putative NES peptide ($^{112}\text{L-E-D-L-V-R-H-M-S-L}^{121}$) was fused in the C-terminal end of EGFP. (D) Expression analysis of EGFP and EGFP-BIVNES by Western Blot from HEK 293T cells transfected with the appropriate constructs. Total cell proteins (50 μg) were separated on 12% SDS-PAGE, electroblotted to nitrocellulose membrane and probed with GFP-specific antibodies. α -Tubulin immunostaining was used as a loading control. The molecular weights of the expressed proteins are indicated in the left margin. (E) HEK 293T cells were transfected with pEGFP or pEGFP-NES. 24 h after transfection, the cells were incubated with LMB as described in Figure 3.5. The cells were fixed and counterstained with DAPI (in blue). The merge image represents the superposition of EGFP and DAPI images. The images shown are representative of the expression patterns (three independent experiments) observed in > 70% of the cells.

3.4.7 The NES motif is critical for the nuclear export activity of BIV Rev

The canonical NES is composed of a short leucine-rich region but other hydrophobic aa like methionine, phenylalanine and valine can substitute for leucine residues (Kutay et Guttinger, 2005; Guttler et al., 2010). Therefore, alanine residues were substituted for the valine, methionine and each of the leucine residues contained within the 112 to 121 aa region of BIV Rev (Figure 3.7A). All the mutant proteins that were generated as Myc/His fusion proteins localized in the nucleus and nucleolus like the WT form of BIV Rev (BIV Rev-Myc/His) (Figure 3.7B). To identify exactly which residues are necessary for the NES function, we utilized the RNA nuclear export assay described above for the measurement of the Rev activity. Results obtained with these mutants revealed that single alanine substitutions of L115, V116, M119 and L121 slightly affected Rev activity, whereas the L112 mutation had an important inhibitory effect when compared to BIV Rev-Myc/His (Figure 3.7C). While double mutations of L112/V116, L112/M119, L112/L121 and V116/L121 severely impaired Rev activity, double mutants involving the L115 residue did not have an important effect on Rev activity (Figure 3.7C), suggesting that this residue is

not part of the NES. It is noteworthy that expression of all mutant proteins was verified by Western blot analysis (bottom of Figure 3.7C) to ensure that the lack of the Rev activity observed with the relevant mutants was not due to the variation in the expression of the mutant proteins. Combined together, the results indicate that the NES of BIV Rev is composed of L112, V116, M119 and L121.

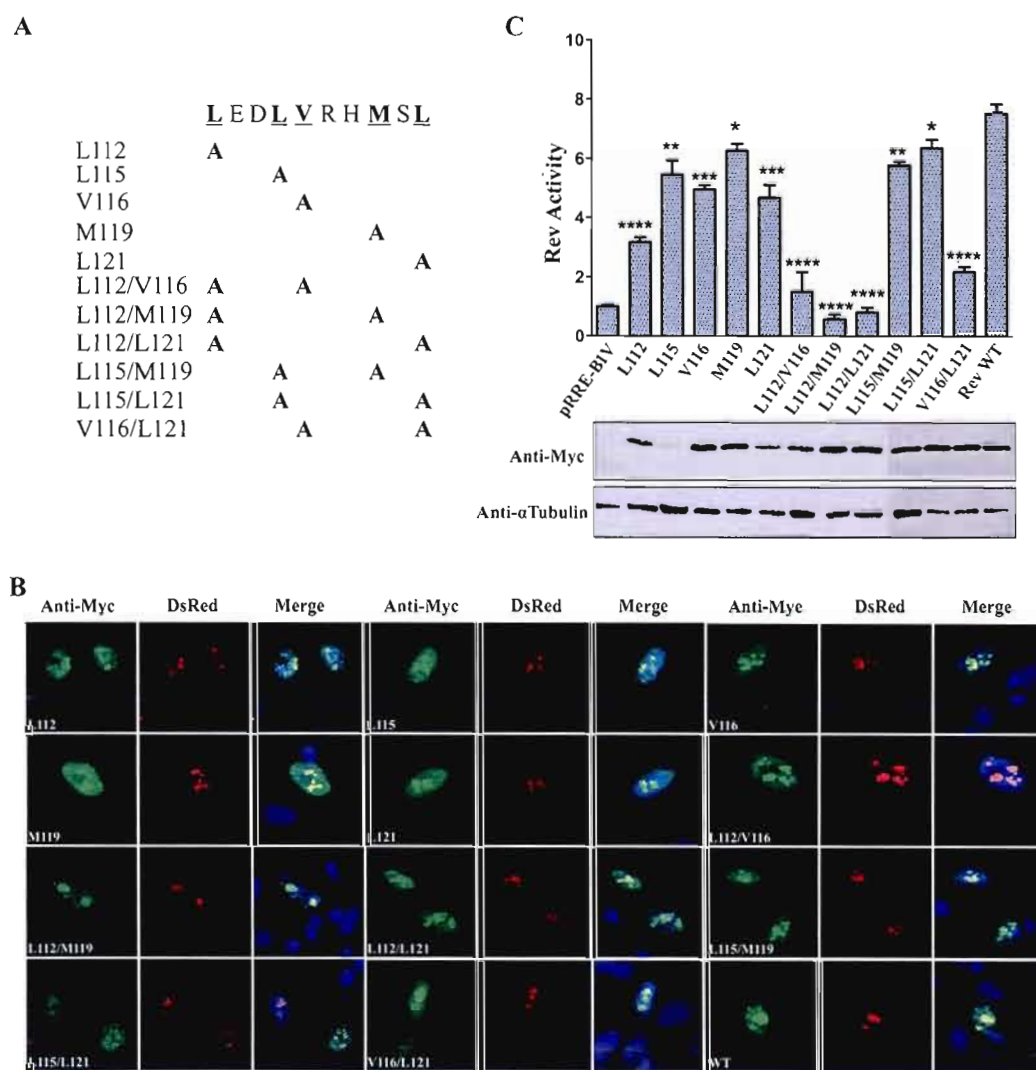


Figure 3.7. Identification of amino acid (aa) necessary for the nuclear exportation of BIV Rev. (A) Alanine substitutions were introduced into

pcDNA3.1Myc/His RevWT targeting the putative NES (¹¹²L-E-D-L-V-R-H-M-S-L₁₂₁) sequence to generate pcDNA3.1Myc/HisRev NES mutant constructs. (B) Cellular localization of BIV Rev-Myc/His NES mutants indicated in A. HEK 293T cells were co-transfected with pRed-C1Nucleolin and each of the indicated pcDNA3.1Myc/HisRev NES mutant constructs. After 48 h of incubation, the cells were fixed and permeabilized. The cMyc/His tagged proteins were visualized by indirect immunofluorescence using a Myc-specific primary antibody and an anti-mouse Alexa 488 secondary antibody. The cells were counterstained with DAPI and examined by fluorescence microscopy. The expression of BIV Rev-Myc/His mutant proteins and DsRedNucleolin is shown in green and red, respectively. The merge image represents the superposition of anti-Myc, DsRed and DAPI images. The images shown are representative of the expression pattern (three independent experiments) observed in > 70% of cells. (C) The nuclear export activity of Rev-Myc/His BIV and Rev-Myc/His BIV NES mutants described in (A) was determined using a CAT reporter assay as described in Figure 3.6 B. The results represent mean values of triplicate samples of at least three separate experiments. Vertical bars indicate standard error about the mean. The values significantly different from BIV Rev-Myc/His by using a two-tailed *t*-test are indicated by asterisks: * *p* < 0.05, ** *p* < 0.005, *** *p* < 0.0005. Also shown is the expression of BIV Rev-Myc/His and BIV Rev-Myc/His mutants as determined by Western Blot from HEK 293T cells transfected with the appropriate plasmid constructs. Total cell proteins (50 µg) were separated on 12% SDS-PAGE, electroblotted to nitrocellulose membrane and probed with Myc-specific antibody. α-Tubulin immunostaining was used as a loading control.

3.5 DISCUSSION

The Rev and Rev-like proteins of complex retroviruses are essential regulatory proteins that mediate the nucleocytoplasmic transport of partially spliced and unspliced viral RNAs via functional domains that interact with both the cellular proteins and viral RNAs. To exert its activity, HIV-1 Rev shuttles between the nucleus and the cytoplasm using import and export cell receptors that interact with the Rev NLS and NES (Pollard et Malim, 1998; Suhasini et Reddy, 2009).

The present study is the first to characterize the nuclear import mechanism of BIV Rev *in vitro*. We demonstrated that BIV Rev is transported to the nucleus by a carrier- and energy-dependent pathway. By using an *in vitro* nuclear import assay, we

showed that BIV Rev is imported via an active transport dependent of cytosolic factors and involving the NPC (Figure 3.1). This active transport mechanism has been reported for proteins harboring classical NLSs, including that of a SV40 antigen T peptide that was used as a positive control in our study (Kehlenbach Ralph H, 2006). We also found that the nuclear import of BIV Rev is dependent of Ran protein (Figure 3.2) suggesting the involvement of karyopherin β family receptors in the import (Gorlich et al., 1996; Gorlich et al., 1997).

The nuclear import of HIV-1 Rev has been studied in details. It does not involve the classical importin α/β pathway but rather is mediated through the involvement of importin β , importin 5, importin 7, importin 9 or transportin which each can directly transport HIV-1 Rev into the nucleus *in vitro* (Truant et Cullen, 1999; Arnold et al., 2006). Importin β was the first described receptor for nuclear import, the mechanism of which involves its interaction with the atypical monopartite, arginine-rich NLS of HIV-1 Rev (Palmeri et Malim, 1999; Truant et Cullen, 1999). Moreover, a recent study confirmed that importin β is a main receptor for the nuclear import *in vivo* of HIV-1 Rev (Gu et al., 2011). In contrast, our results from the *in vitro* nuclear import assay clearly showed that BIV Rev is not transported into the nucleus by importin β alone (Figure 3.3). This result was consistent with the GST pull-down assay data which showed no direct interaction between BIV Rev and importin β (Figure 3.4B).

We previously described a novel type of bipartite NLS in BIV Rev (Gomez Corredor et Archambault, 2009). As importin α is involved in the nuclear transport of bipartite NLS-harboring proteins via the classical nuclear import pathway (Stewart, 2007), we examined whether BIV Rev was imported through this pathway. By using various isoforms of importin α ($\alpha 1$, $\alpha 3$ and $\alpha 5$), we showed that importin $\alpha 3$ or importin $\alpha 5$ can import Rev to the nucleus in combination with importin β (Figure 3.4), clearly demonstrating the involvement of the classical importin α/β nuclear import pathway for BIV Rev. However a nuclear Rev background was observed when

the import assay was conducted in presence of either importin α isoform used alone. Similarly to the situation reported in HIV-1 Rev (Arnold et al., 2006), this nuclear background was still observed even when a specific antibody was used following cell permeabilization to eliminate any residual importin β (Figure 3.4).

Two possibilities could explain this BIV Rev nuclear background. On one hand, the nuclear signal would indeed reflect an import pathway mediated by importin α , independently of importin β (Miyamoto et al., 2002). However, this mechanism can be ruled out because no nuclear localization of BIV Rev was observed in presence of the importin α Δ IBB mutant, a protein that cannot complex with importin β but still can direct on its own the nuclear localization of certain proteins (Miyamoto et al., 2002; Kotera et al., 2005; Nitahara-Kasahara et al., 2007). On the other hand, a transportin-mediated nuclear import pathway might be considered. As mentioned above, transportin can import HIV-1 Rev into the nucleus even though the latter protein does not contain a M9 sequence necessary for interaction with transportin (Siomi et al., 1997). As HIV-1 Rev forms homo-multimeric complex *in vivo* (Daelemans et al., 2004), it was suggested that transportin contains more than one binding site for Rev and, as such, can act as a scaffold for oligomerization of the viral protein already in the cytoplasmic stage of nuclear import (Arnold et al., 2006). As BIV Rev also forms multimers in absence of RNA *in vitro* and *in vivo* (Gomez Corredor and Archambault, unpublished data), transportin alone might also transport BIV Rev in the nucleus. If this assumption is correct, BIV Rev would enter the nucleus through the involvement of at least two nuclear import pathways, the classical importin α/β and the transportin pathways. Both of these nuclear import pathways have been described for other viral and cellular proteins, including the HIV-1 integrase (Muhlhauser et al., 2001; Wodrich et al., 2006; Lin et al., 2009; Levin et al., 2010c).

Lentiviruses infect a broad array of mammalian species including human, simian, bovine, equine, caprine and ovine cells (Corredor, St-Louis et Archambault, 2010). The outcome of lentivirus-associated infections ranges from benign and subclinical (as for BIV) to severe debilitating and lethal disease (as for human AIDS) (Corredor, St-Louis et Archambault, 2010). Cell tropism, protective host cellular factors and potential hiding site from the host's immune system all have been considered to explain differences in lentivirus pathogenicity (Nakayama et Shioda, 2010). Interestingly, studies with the polymerase subunit PB2 of influenza virus showed that the differential use of importins governs cell tropism and host adaptation of that virus. Adaptation of the viral polymerase to host importin may promote interspecies transmission but also enhances pathogenicity of the virus (Gabriel et al., 2011). In addition, a more efficient nuclear import would allow the virus to replicate more rapidly and interfere with the host innate immune system (Boivin et Hart, 2011). Based on the above, it is tempting to speculate that the multiple mechanisms encountered for HIV-1 Rev nuclear importation might have an impact on its virulence and pathogenicity. Since BIV infection is mostly asymptomatic, it would be interesting to determine whether interchanging the NLS between HIV-1 and BIV Rev would have an effect on the virus infectivity *in vitro* and pathogenicity *in vivo*.

Nuclear exportation is necessary for the function of Rev (Pollard et Malim, 1998; Suhasini et Reddy, 2009). CRM1 or exportin 1 is a member of the karyopherins β family proteins and binds leucine-rich NES to export proteins from the nucleus to the cytoplasm. HIV-1 Rev and cyclic-AMP-dependent protein kinase inhibitor (PKI) were the first proteins identified with a leucine-rich NES together with their demonstrated specific interaction with CRM1 (Fischer et al., 1995; Wen et al., 1995; Fornerod et al., 1997). Here, we showed that BIV Rev contains a NES that is CRM1-dependent as demonstrated by the nuclear export blockage of the protein in presence of LMB. We also showed that the region encompassing aa 111 to 130 contains the NES in BIV Rev (Figure 3.5). Bioinformatics analysis of this region was indicative of

a possible sequence of 10 residues ($^{112}\text{L-E-D-L-V-R-H-M-S-L}^{121}$) that would serve as an NES. Fusion of this sequence to EGFP resulted in the sole localization of the fusion protein in the cytoplasm of cells transfected with the relevant plasmid construct, indicating that this 10 aa stretch indeed contains a *bona fide* NES (Figure 3.6). Finally, alanine mutation analyses clearly showed that these aa compose the BIV Rev NES (Figure 3.7).

Following the discovery of HIV-1 Rev and PKI NESs, other NES sequences were identified in numerous cellular and viral proteins (Kutay et Guttinger, 2005; Ding et al., 2010). The NES consensus sequences were then classified into two classes, the HIV-1 Rev-class and the PKI-class with the presence of four key hydrophobic residues in NESs of both classes. The difference between these two classes relies essentially on the size of the spacing sequence between the two first hydrophobic residues that constitute the NES. Thus the HIV-1 Rev- and PKI-class NES consensus sequences were defined as $\phi 1xx\phi 2xx\phi 3x\phi 4$ and $\phi 1xxx\phi 2xx\phi 3x\phi 4$, respectively, where ϕ can be a leucine, isoleucine, valine, methionine or phenylalanine (Fischer et al., 1995; Wen et al., 1995) and x refers to any aa residue. Based on this classification, the BIV Rev NES identified in this study would be of the PKI-class. It is noteworthy that HIV-1 Rev- and PKI-classes of NES consensus sequences were revisited recently on the basis of thoroughly conducted mutation analyses and CRM1 interaction experiments (Guttler et al., 2010). Based on this study, a fifth hydrophobic residue was included at the N-terminal region of the former NES consensus sequences of both classes and was designated ϕ_0 . A novel classification was also proposed on the basis of spacing residues and the type of hydrophobic residues that compose the NES. Thus, the NES consensus sequence of the new HIV-1 Rev-class is composed exclusively of leucine residues except for the second hydrophobic residue which preferentially is a proline with no spacing between this residue and ϕ_0 (Figure 3.8). In contrast, the NES consensus sequence of the novel PKI-class can contain, in addition to the hydrophobic residues listed above,

tryptophan, tyrosine or proline hydrophobic residues with the latter residue being tolerated only at the first position of the NES (Guttler et al., 2010). Also the spacing sequence between the ϕ_0 and ϕ_1 residues is composed of two aa. Consequently, based on this novel classification, the sequence of BIV Rev NES would include an isoleucine at the aa position 108 of BIV Rev (Figure 3.8).

| PKI-class NES | | HIV-1 Rev -class NES | |
|-------------------------|---|-------------------------|--------------------------------------|
| PKI WT NES | NSNEL <u>ALKLAGLDI</u> | Rev NES | LQLPPLER <u>LT</u> L |
| Former consensus | $\Phi^1xxx\Phi^2xx\Phi^3x\Phi^4$ | Former consensus | $\Phi^1xx\Phi^2xx\Phi^3x\Phi^4$ |
| Optimal PKI NES | NINEL <u>ALKFAGLDL</u> | New Rev NES | LQLPPLER <u>LT</u> L |
| New consensus | $\Phi^0xx\Phi^1xxx\Phi^2xx\Phi^3x\Phi^4$ | New consensus | $\Phi^0\Phi^1x\Phi^2xx\Phi^3x\Phi^4$ |
| BIV Rev NES | ¹⁰⁸ IQQLEDLYRH <u>MSL</u> ¹²¹ | | |

Figure 3.8. PKI and HIV-1 Rev classes of NES consensus sequences. Representation of the former and new consensus sequences of the PKI and HIV-1 Rev classes of NES. According to this classification, the NES sequence of BIV Rev is indicated. Φ = L, I, V, F, M, W, P or A, and x refers to any amino acid.

Retroviral Rev/Rev-like proteins contain predicted or experimentally demonstrated NESs that have been classified as leucine-rich, CRM1-dependent NESs based on the inhibitory effect of LMB on the nuclear export of the proteins (Bogerd et al., 1998; Otero et al., 1998; Magin, Lower et Lower, 1999; Yang et al., 1999; Indik et al., 2005). On the basis of the novel NES classification and consensus sequences described above, the NES of HIV-1 Rev is the only representative of its own class among the NESs of Rev/Rev-like proteins whereas the NES of BIV and human T lymphotropic virus Type I Rev fall within the PKI-class of NES (Table 3.1). Finally the NESs of mouse mammary tumor virus (MMTV), human endogenous retrovirus K (HERV-K) and EIAV Rev or Rev-like proteins are unclassified.

TABLE 3.1 NES sequences of Rev/Rev-like proteins

| Retrovirus ^a | Rev/Rev-like proteins | Former NES | New predicted NES | Type |
|-------------------------|-----------------------|------------------|-------------------|--------------|
| MMTV | Rev | LTLFLALLSVLG | | Unclassified |
| HERV-K | Rev | WAQLKKLTQLA | | Unclassified |
| HTLV-1 | Rex | ALSAQLYSSLSLD | MDALSAQLYSSLSL | PKI |
| EIAV | Rev | PLESDQWCRVLRQSLP | | Unclassified |
| FIV | Rev | MTDLEDLFRKLFQSP | MTDLEDLFRKLFQS | Unclassified |
| BIV | Rev | LEDLVRHMSL | IQLEDLVRHMSL | PKI |

^aMMTV: Mouse Mammary Tumor virus; HERV-K: Human endogenous retrovirus K; HTLV-1: Human T-cell leukemia virus type 1; EIAV: Equine infectious anemia virus; FIV : Feline Immunodeficiency virus and BIV : Bovine immunodeficiency virus.

In conclusion, we characterized the mechanisms of the nuclear import and export pathways of BIV Rev which both differ from those of HIV-1 Rev. These mechanisms in addition to the previously described novel types NLS/NoLS (Gomez Corredor et Archambault, 2009) highlight the fact that the BIV Rev is a unique protein within the retrovirus/lentivirus field.

3.6 ACKNOWLEDGEMENTS

A. Gomez Corredor was supported by a graduate studentship from “La Fondation UQAM”. This work was supported by an operating Discovery grant from the National Sciences and Engineering Research Council of Canada to D. Archambault.

CHAPITRE IV

LOCALIZATION OF THE MULTIMERIZATION AND RNA BINDING DOMAINS OF THE BOVINE IMMUNODEFICIENCY VIRUS REV PROTEIN

Andrea Gomez Corredor, Denis Archambault

Département des Sciences Biologiques, Université du Québec à Montréal, Québec,
Canada.

Ce chapitre, présenté sous forme d'article scientifique, va être soumis pour publication dans la revue « *Virus Research* ». La conception et la réalisation des expériences ont été faites par l'auteur de cette thèse (Andrea Gomez Corredor). La rédaction du manuscrit ainsi que le montage des figures ont été réalisées par l'auteur de cette thèse. Le professeur Denis Archambault a contribué de manière importante à la réalisation de cette étude en apportant son expertise scientifique avisée et ses commentaires judicieux, ainsi que le support financier. Pour des raisons écologiques et d'économie de papier, les références de cet article se retrouvent à la fin du manuscrit.

4.1 ABSTRACT

The Rev protein is essential for the replication of lentiviruses. Rev is a shuttling protein that transports unspliced and partially spliced lentiviral RNAs from the nucleus to the cytoplasm. As reported in the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1), lentiviral Rev proteins contain at least three central functional domains: a basic arginine-rich domain that mediates RNA binding (RBD), the nuclear/nucleolar localization signals (NLS/NoLS), a multimerization domain and a leucine-rich domain which are necessary for the nuclear exportation of Rev. Recently, we reported the presence of novel types of NLS and NoLS in the bovine immunodeficiency virus (BIV) Rev protein. Here we report on the multimerization and RBD activities of BIV Rev. Protein cross-linking experiments using recombinant Rev proteins and confocal microscopy analyses showed that BIV Rev multimerizes *in vitro* and *in vivo*, respectively. By using a series of Rev deletion mutants two regions encompassing amino acids (aa) 1 to 30, and 90 to 110 of the BIV Rev sequence were found to be necessary for the multimerization of the protein. To indirectly map the RBD domain of BIV Rev, the plasmid pDM138-BIV which contains, the chloramphenicol acetyltransferase (CAT) reporter gene and the BIV Rev responsive element (RRE) between the HIV-1 donor and acceptor splicing was used. By using the BIV Rev mutants described above, two regions in BIV Rev were identified to mediate RNA binding, indicating a bipartite RBD in BIV Rev. The first RBD motif was found to be located in the middle region of the protein overlapping with the NoLS and the second motif of the bipartite NLS, whereas the second RBD motif mapped in the C-terminal region of BIV Rev. In summary, we conclude that BIV Rev multimerizes *in vitro* and *in vivo* and binds the RRE through bipartite domains, a dual characteristic reported for the first time in a lentivirus Rev protein.

4.2 INTRODUCTION

Lentiviruses are a group of retroviruses that are found in humans and a variety of domestic animals (Corredor et al, 2010). The lentivirus genome contains the typical 5'-3' *gag*, *pol* and *env* structural gene organization and several other open reading frames (Orfs) between or overlapping the *pol* and *env* reading frames. These Orfs include genes that encode transactivator Tat and regulator of expression Rev proteins that play key roles in lentiviral gene expression (Goff, 2007).

The lentivirus life replication cycle involves the synthesis of viral RNAs. Lentiviral mRNAs are divided in three groups: fully spliced, partially spliced and unspliced mRNAs. As described in HIV-1, the fully spliced viral mRNAs encode regulatory proteins including Tat and Rev whereas the partially spliced viral mRNAs produce enzymatic and structural proteins. The unspliced RNAs are template for genomic viral RNAs that will be packaged for the production of progeny viruses (Pollard et Malim, 1998; Suhasini et Reddy, 2009). The fully spliced viral mRNAs are exported from the nucleus to the cytoplasm of the infected cells through standard cellular machinery. In contrast, nuclear exportation of unspliced and partially spliced viral mRNAs is accomplished with the involvement of the Rev protein (Pollard et Malim, 1998). HIV-1 Rev forms a multimeric protein complex on the Rev responsive element (RRE), a secondary RNA structure that is present in unspliced and partially spliced viral mRNAs (Malim et al., 1989a). HIV-1 Rev also forms a complex with CRM1 (a cellular exportin of the karyopherin β family) to transport the viral mRNAs from the nucleus to the cytoplasm of infected cells (Fornerod et al., 1997).

The functional domains of HIV-1 Rev have been well characterized in HIV-1. HIV-1 Rev contains a short stretch of 17 basic amino acids (aa), mainly arginines, that serves as nuclear/nucleolar localization signals and viral RNA binding domain

(RBD) (Hope et al., 1990b). The Rev RBD binds the RRE mentioned above for viral mRNA nuclear export (Malim et al., 1989b). HIV-1 Rev also contains two regions located on each side of the short stretch of basic residues mentioned above; these regions are involved in multimerization of the protein (Malim et Cullen, 1991; Madore et al., 1994). The C-terminal region of HIV-1 Rev contains a nuclear exportation signal (NES), which interacts with CRM1 for exportation of the protein-viral mRNA complexes to the cytoplasm (Fischer et al., 1995).

Multimerization of Rev is essential for the protein function (Malim et al., 1989a; Malim et Cullen, 1991). Several studies in HIV-1 have shown that Rev forms a homo-multimeric complex in presence or absence of RRE *in vitro* and *in vivo* (Fouts et al., 1997; Daelemans et al., 2004). However the mechanism of the oligomeric complex assembly between Rev and RRE *in vivo* is not yet well understood. Initial studies suggested that a single Rev monomer binds to the high-affinity site in RRE and that successive monomers assemble on RRE adjacent regions (Cook et al., 1991; Malim et Cullen, 1991; Daly et al., 1993). Other studies suggested that oligomers of Rev can bind directly the RRE (Olsen et al., 1990; Zapp et al., 1991). The current model is that Rev cooperatively assembles one molecule at a time on RRE via a series of symmetrical tail-to-tail and head-to-head protein-protein interactions (Jain et Belasco, 2001; Pond et al., 2009).

The Bovine immunodeficiency virus (BIV) is a lentivirus that infects cattle. Although most cattle remain asymptomatic, persistent lymphocytosis, neurological disorders associated with central nervous system lesions, weight loss, diminished milk production and opportunistic bacterial infections have been associated with BIV infection (reviewed in (St-Louis, Cojocariu et Archambault, 2004; Corredor, St-Louis et Archambault, 2010). The BIV genome is structurally analogous to that of other lentiviruses and BIV Rev [186 amino acids (aa) in length] is predicted to be functionally similar to HIV-1 Rev (Oberste et al., 1993).

Unlike HIV-1 Rev protein, the functional domains of BIV Rev have not been widely studied. We have recently characterized the NLS and NoLS of BIV Rev (Gomez Corredor et Archambault, 2009). BIV Rev is the first protein among Rev or Rev-like proteins in complex retroviruses harboring a bipartite NLS instead of a monopartite NLS (Cochrane, Perkins et Rosen, 1990; Pollard et Malim, 1998; Yang et al., 1999; Narayan et al., 2003; Indik et al., 2005; Lee et al., 2006). We also found a novel type of NoLS that is different in terms of aa composition and/or localization in the protein from the NoLSs of any cellular or viral proteins including other retroviral Rev and Rev-like proteins (Kubota et al., 1989; Nosaka et al., 1989; Cochrane, Perkins et Rosen, 1990). In addition, the BIV Rev NoLS is independent of NLS function (Gomez Corredor et Archambault, 2009). More recently, we have characterized the shuttle mechanism of BIV Rev. We found that the nuclear exportation of BIV Rev is dependent of a NES that interacts with CRM1 as reported for HIV-1 Rev. We also detailed a mechanism for nuclear importation of BIV Rev *in vitro*. In contrast to HIV-1 Rev which can be directly imported by either importin β or transportin, BIV Rev importation is mediated through the classical import pathway involving the importin α/β heterodimer (Gomez Corredor, 2011).

Here, we have demonstrated that BIV Rev is able to form multimers *in vitro* and *in vivo* in the absence of viral RNAs and identified two regions in BIV Rev that are at play in the multimerization process. In addition, the aa residues that compose the RBD were identified, indicating a bipartite RBD.

4.3 MATERIALS AND METHODS

4.3.1 Cell cultures and transfections

HEK 293T and Cf2Th cells were maintained at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Invitrogen, Carlsbad,

CA) supplemented with 10% fetal bovine serum (PAA Laboratories, Inc., Etobicoke, Ontario). Cell transfections were done in 6-well cell culture plates seeded to a cell density of ~50% confluence. The next day, plasmids were mixed with the FuGENE HD transfection reagent (Roche, Indianapolis, IN) and added to the cells according to the manufacturer's protocol.

4.3.2 Plasmids

To generate recombinant proteins containing a six-histidine tag fused to the C-terminus of Rev protein, deletion mutants of BIV Rev were amplified by PCR from pBluescript KS(+) constructs previously described (Gomez Corredor et Archambault, 2009). Primers that introduce 5' NheI and 3' XhoI restriction sites were used. Digested PCR products were cloned into the pET21b+ vector (Novagen, Madison, WI). The deletion mutants of BIV Rev were validated by DNA sequencing through the McGill University Sequencing Services (Montréal, Québec, Canada).

4.3.3 Purification of recombinant proteins

BIV Rev-His WT and Rev deletion mutant proteins were expressed in Rosetta-gamiTM B (DE3)pLysS cells (Novagen) as previously described (Gomez Corredor, 2011). Briefly, proteins were expressed upon induction with 1 mM isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) for 4 h at 37°C. Cells were pelleted, frozen at -80°C, thawed and resuspended in extraction buffer [0.5% NP40, 0.5% Triton X-100 in phosphate buffer saline solution pH 7.3(PBS)] supplemented with Protease inhibitor cocktail (Roche). Cells were lysed by addition of 1 mg/ml of lysozyme and 2.5 U of benzonase (Novagen) for 20 min on the ice. After sonication, the lysates were cleared by centrifugation at 20000 x g at 4°C for 30 min. Supernatants were incubated with Ni-NTA His•Bind® Resin (Novagen) for 2 h at 4°C. After three washes with extraction buffer, bound proteins were eluted with elution buffer (300 mM imidazole

and 300 mM NaCl) supplemented with Protease inhibitor cocktail and then dialyzed against PBS containing 150 mM NaCl and Protease inhibitor cocktail.

4.3.4 *In vitro* multimerisation assay

To test whether BIV Rev-His WT and mutant proteins were able to form multimers in absence of RRE, an *in vitro* multimerisation assay was realized. A quantity of 5 µg of either recombinants BIV Rev-His WT or each of the mutant proteins were diluted in PBS and treated with 0.02% of glutaraldehyde for 0, 2, 5, 15 and 30 minutes at room temperature. All reactions were quenched with 1 M Tris-HCl pH 8.0. Protein complexes were electrophoretically separated onto 12% SDS-PAGE and a Western blot using an anti-His₆ tag antibody (Qiagen, Mississauga, ON, Canada) was realized to determine the presence of homomultimers.

4.3.5 *In vivo* multimerisation assay

To confirm the ability of BIV Rev to form multimers *in vivo* in absence of the RRE sequence, Cf2Th cells were cultured on coverslips in 6-well cell culture plates and co-transfected with constructs encoding for BIV Rev WT Myc/His and Rev M5 EGFP fusion proteins. Constructs encoding for the BIV Rev WT with a C-terminal Myc/His tag and M5 Rev mutant protein fused to the enhanced green fluorescence (EGFP) protein have been previously described (Gomez Corredor et Archambault, 2009). At 24 h post transfection, cells were washed twice with PBS and fixed with formaldehyde 3.5%. An indirect immunofluorescence assay was carried out with an anti-Myc tag antibody (see below).

4.3.6 Indirect immunofluorescence assay

Cells cultured on coverslips in six-well cell culture plates were transfected with the respective expression vectors. After an incubation of 24 h, the cells were fixed

with 4% paraformaldehyde in PBS for 15 min, permeabilized with 0.2% Triton X-100 for 10 min, blocked with 4% bovine serum albumin in PBS for 1 h at 37°C, and then incubated with mouse primary anti-Myc tag antibodies (1 µg/ml; Roche) for 1 h at 37°C. After three washes with PBS containing 0.2% Triton X-100, the cells were incubated with Cy3-labeled anti-mouse secondary antibodies (Invitrogen) for 1 h at 37°C. Nuclei were counterstained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). The coverslips were then mounted on glass slides using ProLong Gold antifade reagent (Invitrogen).

4.3.7 Fluorescence microscopy

The fluorescence images were taken with an Eclipse Ti fluorescent microscope (Nikon) equipped with a 40× 0.75 numerical aperture objective lens. Images were captured as 8-bit TIFF files with a Scion CFW-1608C camera. All images were analyzed with the Image-J software (Rasband, 1997-2004a). For each protein examined, 50 positive cells were observed. The data shown below were representative of expression patterns observed in > 70% of the cells from three independent experiments.

4.3.8 Chloramphenicol acetyltransferase (CAT) assay

Rev nuclear export activity and RNA binding were quantified in transient transfection assays using a pDM138-based BIV Rev CAT reporter construct as previously described (Gomez Corredor et Archambault, 2009). Briefly, HEK 293T cells were seeded in 12-well cell culture plates and then co-transfected the next day with 0.5 µg of an empty pEGFP or pEGFP constructs encoding for either BIV Rev WT or each of the Rev arginine or lysine mutants that we have previously described (shown in Table 4.1) (Gomez Corredor et Archambault, 2009), 0.5 µg of pRRE-BIV and 0.2 µg of RSV-β-galactosidase plasmid (Fisher Scientific, Nepean, Ontario). The RSV-β-galactosidase plasmid was used as a control for transfection efficiency and

data normalization. 48 h post-transfection, cells were harvested and lysed with the lysis buffer (CAT-ELISA kit; Roche). The amount of CAT in 50 μ g of total cellular proteins was determined using the CAT-ELISA kit. β -galactosidase activity of each cell extract was determined as described before (Gomez Corredor et Archambault, 2009). CAT expression data were normalized through the establishment of a ratio using β -galactosidase activity for each sample. Rev activity was defined as the ratio of CAT quantity obtained from cells transfected with the plasmids containing BIV RRE and Rev WT or Rev mutant-encoding sequences to that obtained by cells transfected with the BIV RRE-containing plasmid alone. All cell transfections were performed in triplicate and the experiments were repeated three times. Statistical analysis was performed using a two-tailed *t*-test.

4.3.9 SDS-PAGE and Western blot analyses

Protein extracts were prepared from transfected cells as previously described (Gomez Corredor et Archambault, 2009). Total cell protein concentrations were quantified using the DC protein assay (Bio-Rad). For each sample, 50 μ g of total cell extract were electrophoretically separated onto a 12% SDS-PAGE. For multimerisation assay, the totality of reaction was separated onto 12% SDS-PAGE. Proteins were then transferred to a nitrocellulose membrane. After, the membranes were blocked in PBS containing 0.05% Tween-20 in the presence of 5% non-fat dry milk powder for 1 h. These membranes were incubated for 1 h at room temperature with a mouse monoclonal primary antibody specific to either EGFP (Roche) or His₆ tag (Qiagen). Following incubation with the antibodies, membranes were washed three times with PBS-T, and incubated for 1 h at room temperature with a secondary anti-mouse horseradish peroxidase-conjugated IgG antibody (Bethyl, Montgomery, TX). The signal was detected by enhanced chemiluminescence (ECL) (Perkin Elmer, Boston, MA) and the membranes were exposed to Kodak Biomax Light-1 films.

4.4 RESULTS

4.4.1 Purification and production of BIV Rev WT and mutant proteins

We previously described the BIV Rev WT gene cloned into the pET21b+ expression vector to produce the pETRevWT construct (Gomez Corredor, 2011). Previously described BIV Rev deleted mutants (Gomez Corredor and Archambault 2009) were also cloned into pET21b+ (Figure 1A). The pETRevWT and pET BIV Rev deleted mutant constructs were then used to transform *E. coli* strain Rosetta-gamiTM B (DE3) pLysS cells to produce proteins upon induction with IPTG. A representative protein expression level is shown in Figure 4.1B for the BIV Rev M2 mutant protein. M2 to M9 Rev mutant proteins were produced to similar levels after 2 h of induction at 37°C whereas a lower level of expression was obtained for the M1 mutant protein.

We then used the prokaryote expression system described above to produce large amounts of protein. After induction in bacteria, all proteins accumulated mainly in the bacterial inclusion bodies as shown for the Rev M2 mutant (Figure 4.1B). A second round of extraction was made from the bacterial inclusion bodies and this procedure allowed us to obtain a substantial quantity of proteins in the supernatant fraction (Figure 4.1C). With that amount of soluble proteins, a method of purification was then developed (see the Material and Methods section). As shown in Figure 4.1C, most proteins were purified from the eluted fractions whereas no significant amount of proteins was found in the flow-through or wash fractions. Nevertheless, a slight amount of contaminating proteins was observed in the eluted fraction obtained for the M2 mutant protein (Figure 4.1D).

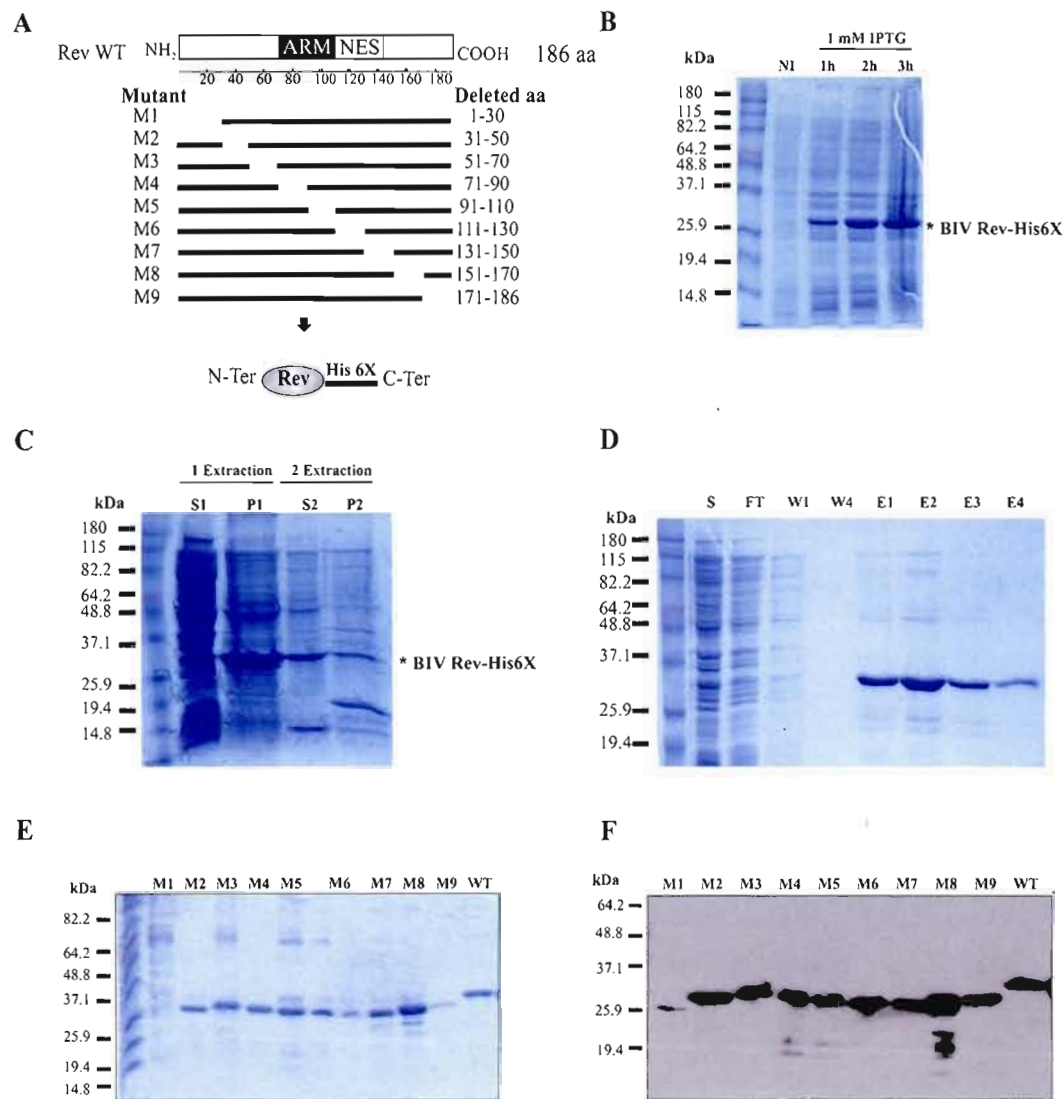


Figure 4.1. Expression and purification of BIV Rev mutant proteins. A. Schematic representation of the Rev mutant His tagged proteins that were generated from pET21b+. B. SDS electrophoresis in 10% polyacrylamide gel of the fractions obtained by induction of the recombinant BIV Rev-His M2 protein from *E. coli* BL21 (DE3) pLysS stained with Coomassie blue. Lane 1, molecular weight, lane 2, lysate from *E. coli* BL21(DE3) pLysS expressing the plasmid pETRevM2 without induction (NI); lane 3, 4 and 5 refer to lysates from *E. coli* after induction for 1 h, 2 h and 3 h, respectively, for the expression BIV Rev-His M2 protein. C. Electrophoresis conditions as described in B, two rounds of protein extraction for lysate of *E. coli* expressing BIV Rev-His M2 mutant, S: supernatant, P: Pellet, containing the inclusion bodies. D. Steps of purification of BIV Rev-His M2 mutant; S: supernatant,

FT: flow-through, *W*: wash and *E*: elution. E. Purified proteins of all mutants showed in A and stained with Coomassie blue. F. Confirmation of the presence of His tag in the mutant proteins by Western blot using an anti-His₆ tag antibody.

All mutant proteins were then purified using this protocol. As shown in Figure 4.1E, the quantity of purified proteins was similar for BIV Rev M2, M3, M4, M5, M6 and M7 mutants (Figure 4.1E). A higher amount of purified protein was obtained for the M8 mutant whereas the M1 and M9 mutant proteins were obtained at much less quantities. The quality of all purified proteins was confirmed by Western blot analysis using an (Figure 4.1F).

4.4.2 BIV Rev WT protein forms multimers *in vitro*

HIV-1 Rev has been reported to multimerize *in vitro* in the absence of RRE (Fouts et al., 1997). To determine whether BIV Rev WT protein is able to form multimers; *in vitro* experiments were conducted with the glutaraldehyde (GA) method described for HIV-1 Rev (Fouts et al., 1997). GA is a chemical protein cross-linker that offers the possibility of identifying transient and stable protein interactions *in vitro*. When two proteins physically interact with each other, GA allows the formation of covalent bonds between the proteins by using a bi-functional reagent containing reactive end-groups that react with the aa functional primary amine and sulphhydryl moieties, thus allowing covalent cross-linkage of the molecules (Baumert et Fasold, 1989).

Multimerization analyses revealed that BIV Rev WT formed homo-multimeric complexes. As shown in Figure 4.2 (lane 0) purified BIV Rev WT formed dimers due to its capability to aggregate. However, when GA was added to the protein homo-multimeric complexes like trimers, tetramers and even higher oligomeric forms of BIV Rev were observed after a GA exposition time of 2 min (Figure 4.2). The same pattern of multimeric complex formation was obtained after 5, 10, 15 and 30 min

exposition of GA with a linear decrease of the monomeric and dimeric forms of BIV Rev (Figure 4.2).

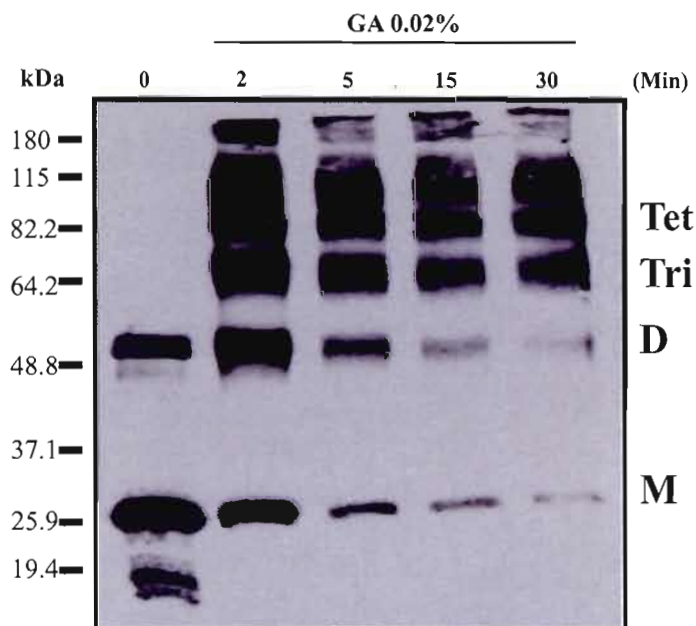


Figure 4.2. *In vitro* multimerization of BIV Rev WT protein. 5 μ g of purified BIV Rev-His WT protein was kept untreated (0 min) or was incubated with glutaraldehyde (GA) 0.02% for 2, 5, 15 and 30 min at room temperature. The reaction was stopped and loading buffer SDS-PAGE was added. Samples were denatured and deposited on 12% SDS-PAGE. A Western blot was then performed using an antibody against the His₆ tag. *M*: monomers, *D*: dimers, *Tri*: trimers and *Tet*: tetramers.

4.4.3 BIV Rev WT protein forms multimers *in vivo*

HIV-1 Rev protein has been reported to multimerize in the cell cytoplasm and nucleolus in absence of RRE (Daelemans et al., 2004). The homo-oligomerization results we obtained with the purified protein *in vitro* prompted us to determine whether BIV Rev was also able to form multimers in absence of RRE *in vivo*. To do so, we used EGFP-fused BIV Rev M5 mutant protein that contains a functionally disrupted bipartite NLS which prevents the protein to enter into the nucleus (Gomez Corredor et Archambault, 2009). As shown in Figure 4.3, the M5 mutant localizes

only in the cytoplasm in contrast to BIV Rev WT which localizes in both the nucleus and nucleolus of cells transfected with the respective plasmid constructs. Co-transfection of cells with both constructs showed the ability of BIV Rev WT (in red in the figure 4.3) of transporting the BIV Rev M5 mutant (in green in the figure) to the nucleus and nucleolus as observed in the merge image panel (Figure 4.3). This result indicates that the BIV Rev M5 mutant and WT proteins multimerized in the cytoplasm prior to the import of the complex in the nucleus. Thus one may conclude that BIV Rev can multimerize *in vivo* in the cytoplasm.

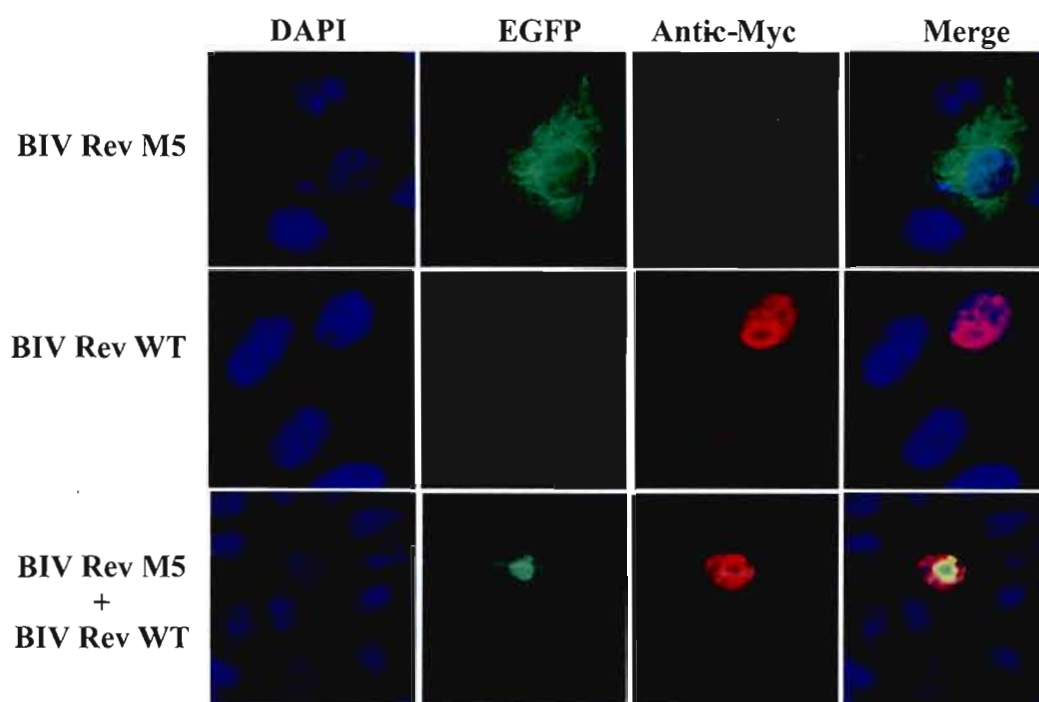


Figure 4.3. *In vivo* multimerisation of BIV Rev protein. Cf2Th cells were seeded on coverslips in 6-well plates and transfected with vectors pEGFP RevM5 and pcDNA3.1cMyc/His BIV Rev WT. 24 h after transfection, cells were fixed and immunofluorescence was performed with monoclonal anti-Myc, and a secondary antibody coupled to Cy3. Nuclei were stained with DAPI, photos were taken using fluorescence microscope Eclipse T1 (Nikon).

4.4.5 Two regions in BIV Rev are involved in protein multimerization

HIV-1 Rev has two regions essential for its multimerization. These regions are located at each side of the arginine-rich domain of the protein (Malim et Cullen, 1991; Madore et al., 1994). In order to identify the region required for the multimerisation of BIV Rev, a series of 20 to 30 aa mutants (Gomez Corredor et Archambault, 2009) were purified and used in the *in vitro* multimerization assay. As shown in Figures 4.2 and 4.4, the M2, M3, M4, M6, M7, M8 and M9 mutants had a multimerization pattern similar to that of BIV Rev WT with a linear decrease of the monomeric form over time and a paralleled increase of dimeric, trimeric and tetrameric forms of the proteins. The M4 mutant was able to form homo-multimeric forms even in absence of GA. In contrast, the M1 and M5 mutants only formed dimers in presence of GA (Figure 4.4). Taken together, these results indicate that two regions within M1 and M5 deleted sequences are at play in BIV Rev multimerization.

4.4.6 Mapping the RNA binding domain (RBD) of BIV Rev

RBDs in proteins are generally composed of arginine-rich motifs (ARM) with a small number of other types of aa residues (Bayer et al., 2005). As mentioned before, HIV-1 Rev has a 17 aa-long ARM that serves as RBD, NLS and NoLS (Hope et al., 1990b). To map the residues in BIV Rev associated with RBD function, we used a series of previously published mutant proteins in which selected arginines (R) and lysines (K) in BIV Rev WT sequence were replaced by alanine (A) residues (Gomez Corredor et Archambault, 2009) (Table 4.1).

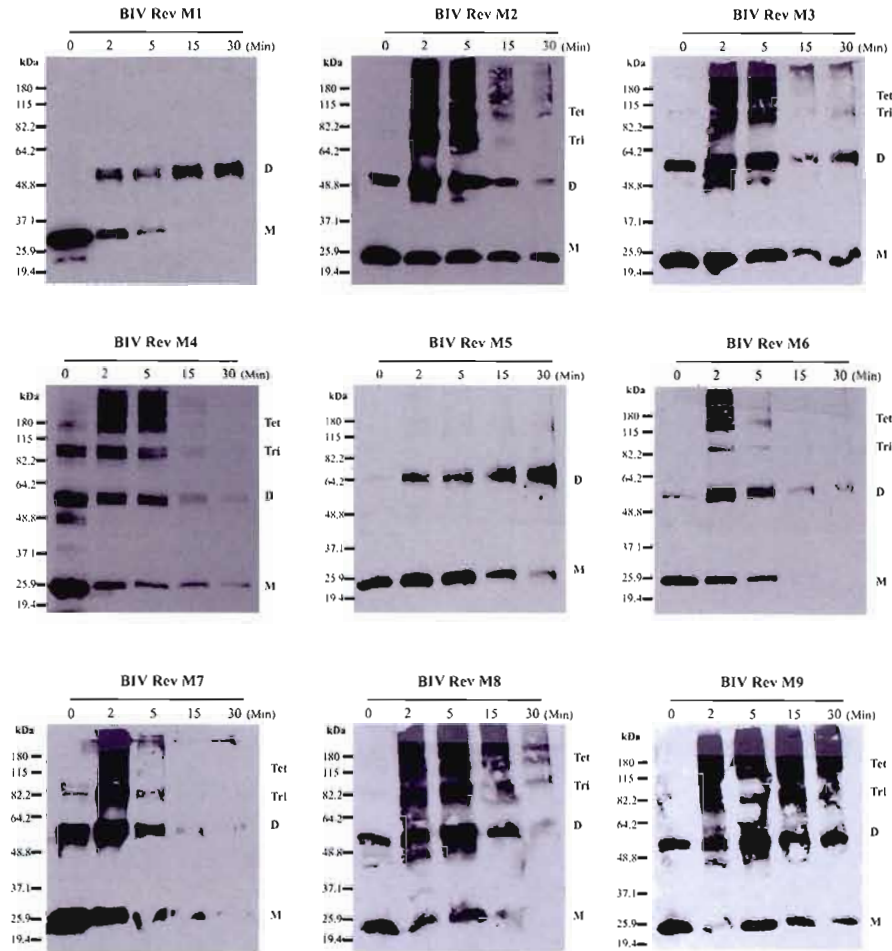


Figure 4.4. Oligomeric formation of BIV Rev mutants. 5 μ g of purified BIV Rev-His mutant proteins described in Figure 1A were kept untreated (0 min) or were incubated with glutaraldehyde (GA) 0.02% for 2, 5, 15 and 30 min at room temperature. The reaction was stopped and loading buffer SDS-PAGE was added. Samples were denatured and deposited on 12% polyacrylamide gel. A Western blot was then performed using anti-His tag. *M*: monomers, *D*: dimers, *Tri*: trimers and *Tet*: tetramers.

As the mutant proteins were used to map the NLS and NoLS of BIV Rev, in this study we selected only the mutants whose nuclear localization was not impaired (Gomez Corredor et Archambault, 2009). As expected, all selected BIV Rev mutant proteins predominantly entered the nucleus (Figure 4.5A). The Rev activity of

these mutants was then determined using a CAT reporter assay dependent of the BIV RRE sequence, thereby evaluating both the RNA binding and export capacities of Rev (Gomez Corredor et Archambault, 2009). Among all BIV Rev mutants tested (Figure 4.5B)

TABLE 4.1. Listing of BIV Rev RBD mutant proteins^a

| Mutant | ⁷¹ R | ⁷³ R | ⁷⁴ K | ⁸⁴ K | ⁸⁷ R | ⁹⁴ R | ⁹⁵ R | ⁹⁶ K | ¹⁰⁶ R | ¹⁰⁷ R | ¹⁵⁴ K | ¹⁵⁶ K | ¹⁵⁷ R |
|--------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| Mut 1 | A | | | | | | | | | | | | |
| Mut 2 | | A | A | | | | | | | | | | |
| Mut 4 | | | | A | | | | | | | | | |
| Mut 5 | | | | | A | | | | | | | | |
| Mut 7 | | | | | | A | | | | | | | |
| Mut 8 | | | | | | | A | | | | | | |
| Mut 9 | | | | | | | | A | | | | | |
| Mut 11 | | | | | | | | | A | A | | | |
| Mut 13 | | | | | | | | | | | | A | |
| Mut 14 | | | | | | | | | | | | | A |
| Mut 21 | | | | | | | | | | | A | A | A |

^a The indicated arginine (R) and lysine (K) residues in the BIV Rev sequence were changed to alanine (A) residues, the number indicate the position of residues (Gomez Corredor et Archambault, 2009).

Mut 5 and Mut 21 mutants had no activity at all, a finding already reported by us for Mut 5 (Gomez Corredor et Archambault, 2009). Mut 7, 8, 11, 13 and 14 mutants showed a Rev activity which was at least 50% of that of BIV Rev WT. All other mutants tested had an activity comparable to that of BIV Rev WT. Taken together, the regions encompassing aa ⁸⁷R to ¹⁰⁷R (deleted in Mut 5, 8, 9, 11) and ¹⁵⁴K to ¹⁵⁷R (deleted in Mut 21) are involved in RBD activity of Rev, indicating the presence of a bipartite RBD for BIV Rev.

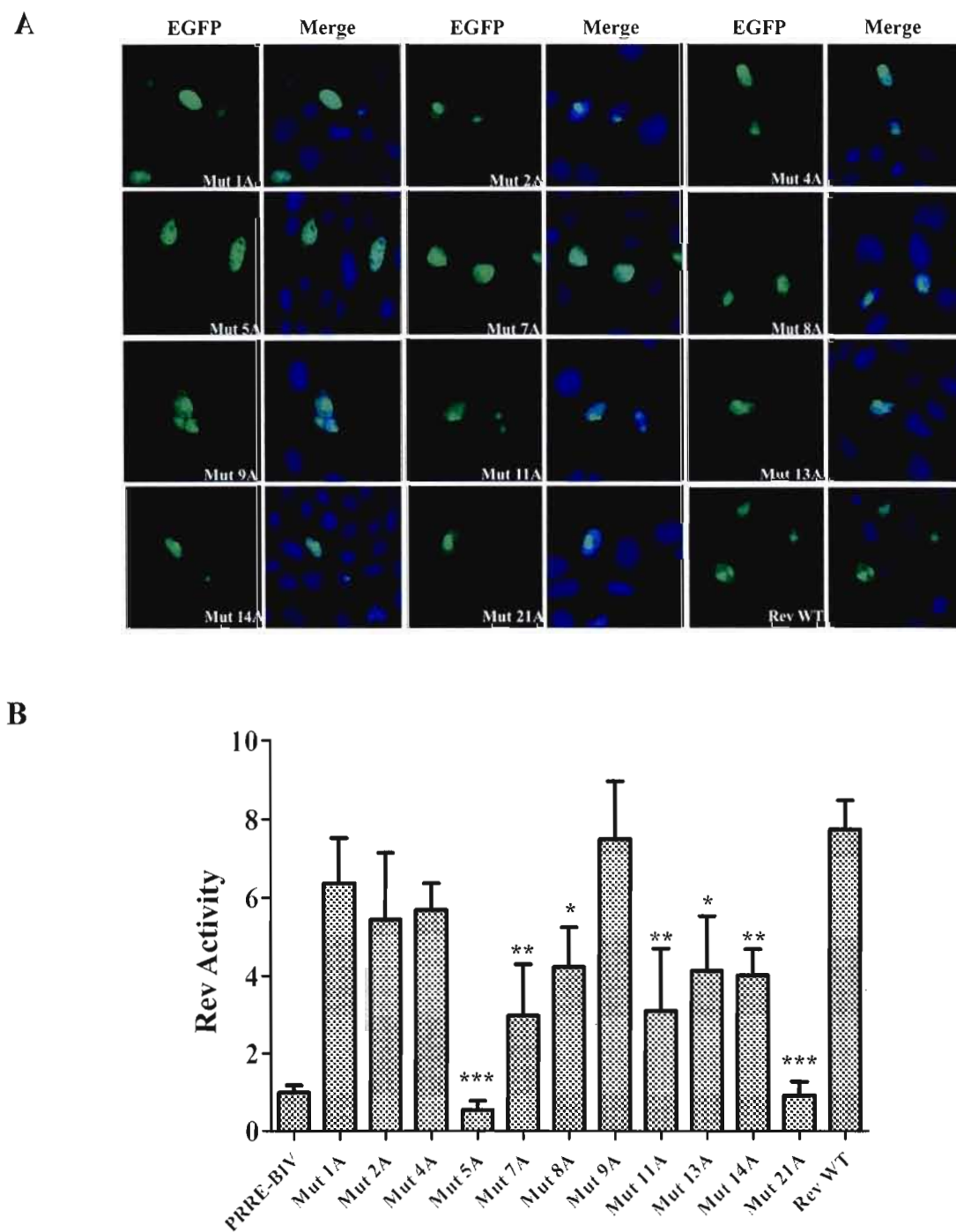


Figure 4.5. Mapping of the RBD of BIV Rev. A. Intracellular localization of EGFP BIV Rev mutant proteins shown in Table 1. HEK 293T cells were transfected with the indicated pEGFP-BIV Rev mutant constructs. After 24 h of incubation, the cells

were fixed, counterstained with DAPI (in blue) and examined by fluorescence microscopy. The merge image represents the superposition of EGFP and DAPI images. The images shown are representative of the expression pattern (three independent experiments) observed in > 70% of cells. B. The nuclear export activity of EGFP-Rev BIV and EGFP-Rev BIV mutants described in A. The nuclear export activity of EGFP-Rev BIV fusion proteins was determined using a CAT reporter assay. 50 μ g of cell lysate was used in the CAT assay. The CAT levels were normalized to the β -galactosidase activity. The results represent mean values of triplicate samples of at least three separate experiments. Rev activity is expressed as the mean ratio of EGFP-Rev BIV (Rev WT) or mutant CAT expression versus basal expression of pRRE-BIV alone. Vertical bars indicate the standard error about the mean. *: value significantly different ($p < 0.05$), **: value significantly different ($p < 0.005$) and ***: value significantly different ($p < 0.0005$), from EGFP-Rev BIV using a two-tailed *t*-test.

4.5 DISCUSSION

RNA binding and multimerization of HIV-1 Rev are essential steps in the life replication cycle of the virus (Daugherty, D'Orso et Frankel, 2008). RNA binding and multimerization domains in HIV-1 Rev have been completely characterized (Pollard et Malim, 1998) as well as the regions of the viral RNA-containing RRE sequence that interact with Rev (Hope et al., 1990b; Huang et al., 1991; Malim et Cullen, 1991; Mann et al., 1994; Pollard et Malim, 1998; Jain et Belasco, 2001; Daugherty, D'Orso et Frankel, 2008; Daugherty, Liu et Frankel, 2010). *In vitro* and *in vivo* multimerization in absence of RRE have been demonstrated (Fouts et al., 1997; Daelemans et al., 2004) for HIV-1 Rev as well as for Rev or Rev-like proteins from other retroviruses including Equine infectious anemia virus (EIAV), Human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) and Human endogenous retrovirus K (HERV-K) (Bogerd et Greene, 1993; Harris et al., 1998; Boese et al., 2001). Studies of *in vivo* multimerization of HIV-1 Rev using fluorescence resonance energy transfer (FRET) and fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) procedures showed that the protein multimerizes in the cytoplasm and the nucleolus in absence of RRE. These observations support the model by which Rev moves back and forth between the

nucleus and cytoplasm as a multimeric complex to fulfill its function of transporting the viral RNAs (Daelemans et al., 2004).

The present study is the first to report the ability of BIV Rev to multimerize *in vivo* and *in vitro* in absence of RRE. BIV Rev was shown to form homo-multimeric complexes *in vitro* as demonstrated by the presence of dimeric, trimeric, tetrameric and higher oligomeric forms of the protein (Figure 4.2). This result was confirmed in an experiment conducted *in vivo* (Figure 4.3). BIV Rev WT (which localizes in the nucleus/nucleolus) and BIV Rev M5 mutant (which does not localize to the nucleus) (Gomez Corredor et Archambault, 2009) formed complexes in the cytoplasm allowing them to be transported in the nucleus. Based on this result, one may conclude that the bipartite NLS present in BIV Rev WT but absent in M5 mutant was sufficient to mediate the transport of the M5-Rev WT complex to the nucleus.

In addition to the demonstrated capacity of BIV Rev to multimerize *in vitro* and *in vivo*, our study also showed that two regions in BIV Rev are involved for multimerization of the protein *in vitro*. This was demonstrated by using deletion mutants of BIV Rev that were tested for their capacity to form multimers *in vitro*. Two of these Rev mutants, namely M1 and M5, were unable to form complexes other than dimers in contrast to BIV Rev WT (Figure 4.4). The deleted regions within M1 and M5 mutant proteins were from aa 1 to 30, and aa 91 to 110 aa of the BIV Rev WT sequence, respectively. One may conclude that these regions are responsible for multimerization of BIV Rev *in vitro*. However, the exact aa residues essential for BIV Rev multimerization have yet to be determined.

As mentioned before, HIV-1 Rev contains two multimerization domains localized at each side of the ARM. The exact mechanism for the multimerization of Rev over the RRE sequence was for a long time not well understood. The main reason for this was the propensity of HIV-1 Rev to aggregate and to form long filaments even in

presence of the RRE sequence (Daugherty et al., 2010). However, in a recent study was described the mechanism of assembly of HIV-1 Rev onto the RRE by using crystallographic analyses of the Rev/RRE complex (Daugherty, Liu et Frankel, 2010). In this study, a Rev mutant that was able to form only dimers was used. The authors showed that HIV-1 Rev multimerization is physically coupled to cooperative RNA recognition. Thus, the structure achieved during multimerization determines the orientation of HIV-1 Rev ARM towards RRE and facilitates the binding of Rev dimers over regions different from stem IIB of the RRE sequence known to bind the protein (Daugherty et al., 2010). This highly-ordered process of HIV-1 Rev multimerization creates a nuclear export adaptor by which one face of the multimer binds viral RNA and the other face binds the CRM1 protein. This sophisticated mechanism of protein ARM-RNA interaction first demonstrated with HIV-1 Rev would allow the protein to escape functionally deleterious mutations within particular RNA binding sites (Daugherty, Liu et Frankel, 2010). Whether BIV Rev has a similar mechanism for multimerization is at present unknown. However, should the mechanism be different, it would be interesting to determine whether it could be taken into account to explain the lack of pathogenicity for BIV in contrast to HIV-1.

Viral proteins such as HIV-1 Rev and Tat, HTLV-1 Rex and BIV Tat are typical examples of proteins harboring an ARM that acts as a RBD (Bayer et al., 2005). In these and in other Rev and Rev-like proteins, RBD is closely associated to the NLS/NoLS (Hope et al., 1991; Yang et al., 1999; Magin et al., 2000). Here, experiments were conducted to map the RBD of BIV Rev by using a series of mutants harboring alanine scan mutations and an intact NES (listed in Table 4.1) (Gomez Corredor et Archambault, 2009). All mutant proteins mainly localized in the nucleus (Figure 4.5A), a prerequisite in our experiment to ensure that the proteins were able to enter into the nucleus for RNA binding (Figure 4.5A). The mutant constructs were then co-transfected in cells and analyzed by using a CAT gene reporter assay that relying on the presence of BIV RRE localized upstream of the

CAT-encoding gene (Gomez Corredor et Archambault, 2009). Thus, Rev binding to RNA (RRE) in the nucleus would result in the cytoplasmic transport of the CAT transcript, and, thereof, in CAT transfection indicating a Rev activity. By using this assay, two stretches of basic residues localized in the middle and C-terminal regions of BIV Rev were found to mediate RNA binding. On one hand, Mut 5 and Mut 21 mutants had no Rev activity at all (Figure 4.5B). It is noteworthy that, the mutated residue within the Mut 5 mutant was part of the BIV Rev NoLS. Mut 7 and Mut 8 mutants (the mutated residues of which were part of the BIV Rev NLS) as well as the Mut 11 mutant (the mutated residues of which were part of neither BIV Rev NoLS nor NLS) showed a diminished Rev activity. All mutated arginines in the Mut 5, 7, 8 and 11 mutants are localized in the middle region of BIV Rev (⁸⁷RELVEQNRRKQERRLSGLDRR¹⁰⁷). We also found that the integrity of three basic residues localized in the C-terminal region of BIV Rev was necessary for Rev activity. This was shown by the data obtained with the Mut 13 and Mut 14 single mutants that showed a diminished Rev activity (Figure 4.5B). These results were confirmed with the use of Mut 21 mutant where mutations of ¹⁵⁴K-KR¹⁵⁷ residues into ¹⁵⁴A-AA¹⁵⁷ significantly affected the Rev activity. Combined together, these results show that BIV Rev harbours two regions necessary for RNA binding, thereby indicating a bipartite RBD. This finding contrasts with the monopartite nature of the RBD present in HIV-1 Rev (Pollard et Malim, 1998; Bayer et al., 2005) but is in agreement with the bipartite RBD present in EIAV Rev (Lee et al., 2006). Thus, BIV and EIAV Rev would be the only Rev or Rev-like proteins in retrovirus harboring a Rev bipartite RBD. However, *in vitro* protein-RNA (RRE) interaction experiments are needed to unequivocally confirm the BIV Rev results.

The EIAV Rev RBD is composed of two shorts ARMs. The first ARM is localized in the central region of the protein whereas the second ARM overlaps the NLS sequence in the C-terminal region of the protein (Lee et al., 2006) Although the BIV Rev RBD motifs also localize in the central and C-terminal regions of the

protein, the aa sequences that compose these motifs differ from those of EIAV Rev RBD. In BIV, the five arginine residues that compose the first ARM are scattered within a 21 aa-long sequence (⁸⁷**RELVEQNRRKQERRLSGLDRR**¹⁰⁷) overlapping the BIV Rev NoLS/NLS for the first three residues (Gomez Corredor et Archambault, 2009). This motif contrasts with the short RRDRW sequence that composes the first ARM motif of the EIAV Rev RBD (Lee et al., 2006). The second motif of BIV Rev RBD is composed of two lysines and one arginine (¹⁵⁴**KLKR**¹⁵⁷), and thus does not represent an ARM per se but rather should be only defined as a motif rich in basic residues. This aa composition contrasts with that of the second ARM of the EIAV Rev RBD that is a truly arginine-rich motif (KRRRK) (Lee et al., 2006).

In summary, we have characterized the multimerisation and RBD domains of BIV Rev that differ from those of HIV-1 and/or EIAV Rev. These results combined with those of our previously published work (Gomez Corredor et Archambault, 2009; Gomez Corredor, 2011) where novel types of NLS and NoLS were found show that BIV Rev is an atypical protein among Rev or Rev-like proteins in retroviruses.

CHAPITRE V

DISCUSSION GÉNÉRALE

5.1 La protéine Rev du VIB est atypique en comparaison avec les autres protéines Rev ou Rev-like des rétrovirus

Le virus le plus étudié de la famille *Retroviridae* est le VIH-1. Chacune des protéines ainsi que ses ARNs et ADNs viraux ont été décortiqués et profondément étudiés. Parmi ces protéines, on retrouve la protéine Rev, une protéine accessoire dont l'unique rôle connu jusqu'à la fin des années 90 était le transport des ARNs non épissés et partiellement épissés du noyau vers le cytoplasme, pendant la phase tardive de l'infection. Pour accomplir cette fonction, Rev lie un RRE qui se retrouve dans les ARNs non épissés et partiellement épissés et utilise ses différents domaines fonctionnels (Cullen, 1998; Pollard et Malim, 1998; Hope, 1999). De la même façon que le VIH-1 représente le modèle par excellence, la protéine Rev du VIH-1 est la plus étudiée parmi les protéines Rev des autres membres de la famille *Retroviridae*.

L'organisation des domaines fonctionnels de Rev du VIH-1 est montrée dans la Figure 5.1. Dans la partie amino-terminale, on retrouve une région de type ARM qui contient le domaine RBD (Daly et al., 1989; Green et Zapp, 1989; Zapp et Green, 1989; Hope et al., 1990b) et les signaux de type NLS et NoLS (Kubota et al., 1989; Malim et al., 1989a; Perkins et al., 1989; Berger et al., 1991; Bohnlein, Berger et Hauber, 1991). Les régions situées de chaque côté du ARM servent de domaine de multimérisation (Olsen et al., 1990; Zapp et al., 1991; Bogerd et Greene, 1993; Madore et al., 1994). La partie carboxy-terminale de la protéine contient le signal d'exportation ou NES, originalement connu comme domaine d'activation. Tous ces domaines sont nécessaires pour accomplir la fonction de Rev (Venkatesh et

Chinnadurai, 1990; Malim et al., 1991; Weichselbraun et al., 1992; Fischer et al., 1995; Wen et al., 1995).

L'objectif principal de ce projet était la caractérisation des différents domaines fonctionnels de la protéine Rev du VIB, le but à long terme étant d'aider à mieux connaître la biologie des lentivirus différents du VIH-1. Les résultats obtenus dans la présente étude ont permis de déterminer que Rev du VIB est une protéine atypique en raison de la structure de ses domaines fonctionnels, par rapport non seulement à la protéine Rev du VIH-1 mais également aux autres protéines Rev ou « *Rev-like* » de la famille *Retroviridae* qui ont été caractérisées jusqu'à maintenant.

5.1.1 Les NLS et NoLS

Comme démontré dans le chapitre II, la protéine Rev du VIB est la première de la famille des protéines Rev ou « *Rev-like* » à avoir un signal NLS de type bipartite et un NoLS qui est fonctionnellement indépendant du NLS. Les signaux NLS et NoLS sont de type monopartite dans les protéines Rev des virus VIH et EIAV ainsi que dans les protéines « *Rev-like* » des virus HTLV-1, HERV-K et MMTV. De plus, les NLS et NoLS de ces virus se chevauchent dans un domaine de type ARM (voir Figure 5.1). Aussi, comme observé dans le tableau 2.2, les signaux NLS et NoLS identifiés dans le VIB ne font partie d'aucune classification connue pour ce type de signaux (Emmott et Hiscox, 2009; Kosugi et al., 2009). Le NLS bipartite identifié dans la protéine Rev du VIB diffère des autres signaux NLS par la composition de ses deux motifs basiques et par la longueur de sa séquence d'espacement « *spacer* ». Ces motifs sont principalement riches en arginines, alors que la plupart des signaux bipartites rapportés sont riches en lysines (Lange et al., 2007; Kosugi et al., 2009). De plus, la longueur de la séquence spacer qui sépare les deux motifs basiques est atypique.

Normalement, les NLS bipartites sont classés en deux catégories courtes ou longues. Les NLS courts contiennent une séquence « *spacer* » d'environ 8 à 16 aa, et les NLS longs de 30 à 32 aa (Romanelli et Morandi, 2002). La séquence « *spacer* » du NLS bipartite de la protéine Rev du VIB est de 20 aa. Une seule protéine avec un NLS bipartite et une séquence « *spacer* » de 20 aa a été décrite à ce jour, soit la protéine HDCA, mais la différence avec le NLS de Rev du VIB est la composition des motifs basiques qui seront plus riches en lysines (Somasekaram et al., 1999).

Le NoLS de la protéine Rev du VIB est aussi atypique. Les signaux NoLS n'ont pas été profondément étudiés en comparaison des NLSs. Les études sur les différents types de NoLS ont été initiées seulement après la découverte des nouvelles fonctions du nucléole, comme par exemple son rôle clé dans des fonctions cellulaires et sa possible implication dans les processus infectieux de différents virus (Dove et al., 2006; Matthews et Olson, 2006; Hiscox, 2007; Lymberopoulos et Pearson, 2007; Emmott et al., 2008; Emmott et Hiscox, 2009; Stark et Taliansky, 2009).

Le NoLS identifié dans la protéine Rev du VIB est différent du motif consensus observé dans la majorité des NoLS identifiés jusqu'à ce jour (Horke et al., 2004; Emmott et Hiscox, 2009). La séquence consensus des NoLS connus est formée de 4 résidus dont trois résidus de type arginine ou lysine aux positions 1, 2 et 4 et un autre variable (x) à la position 3 (**R/K-R/K-x-R/K**). Le NoLS de la protéine Rev du VIB est constitué uniquement de résidus arginines qui sont contenus dans une région de 18 aa (⁷⁶**ERRPGFWKSLRELVEQNR**⁹⁴). Les caractéristiques particulières trouvées dans les signaux NLS et NoLS de la protéine Rev du VIB (voir Figure 5.1) appuient le caractère atypique de cette protéine, non seulement dans le contexte des protéines Rev ou « *Rev-like* » de la famille *Retroviridae*, mais également par rapport aux autres protéines rapportées dans la littérature à ce jour, peu importe leur nature.

5.1.2 Le RBD

Dans le chapitre IV de cette étude, nous avons démontré que la protéine Rev du VIB a un domaine de liaison à l'ARN ou RBD de type bipartite. Comme démontré dans la figure 4.5, l'intégrité des deux motifs qui forment le RBD est nécessaire à sa fonction. Le premier motif est situé dans la région centrale de la protéine et est constitué de 5 résidus de type arginine qui sont espacés dans une région de 21 aa (⁸⁷RELVEQNRRKQERRLSGLDRR¹⁰⁷). Les trois premiers résidus font partie des NoLS et NLS et les deux derniers ne font partie d'aucun signal. Le deuxième motif est localisé dans la partie C-terminale de la protéine et se compose de 3 résidus, principalement de type lysine (¹⁵⁴KLKR¹⁵⁷), très rapprochés l'un de l'autre.

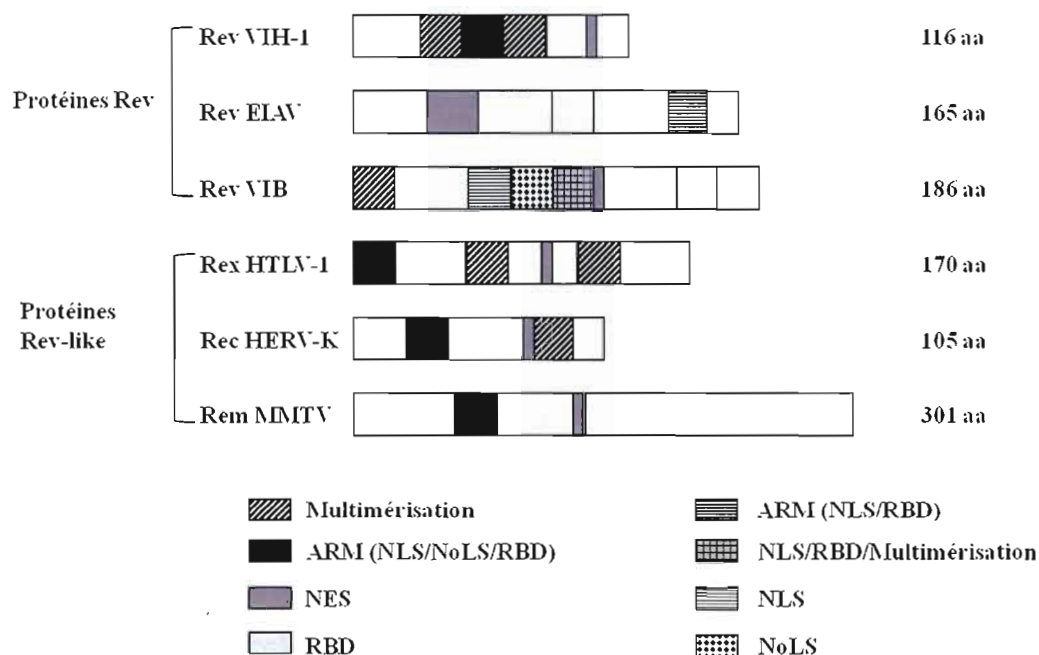


Figure 5.1 Domaines fonctionnels des protéines Rev et « Rev-like » des virus de la famille *Retroviridae*. Domaine riche en arginine (ARM), domaine de liaison à l'ARN (RBD), signaux de localisation nucléaire (NLS) et nucléolaire (NoLS) et domaine d'exportation du noyau (NES).

Ce type de domaine RBD bipartite a déjà été observé chez la protéine Rev de l'EIAV (Lee et al., 2006) (voir Figure 5.1). Cependant, les deux domaines RBD bipartites de Rev VIB et EIAV sont très différents. En effet, le premier motif du RBD de la protéine Rev de l'EIAV (**RRDRW**) est constitué d'un court segment riche en arginines, à la différence des 5 résidus arginine espacés qui font partie du premier motif de Rev du VIB. Contrairement à ce qui a été observé pour la protéine Rev du VIB, aucun des résidus du premier motif de la protéine Rev de l'EIAV ne fait partie des autres signaux. De plus, le deuxième motif du RBD de la protéine Rev de l'EIAV est aussi composé d'une courte région riche en arginines (**KRRRK**). Cependant, à la différence du deuxième motif de la protéine Rev du VIB, tous ces résidus font aussi partie du signal NLS de la protéine Rev de l'EIAV (Lee et al., 2006). Le deuxième motif de la protéine Rev du VIB est plutôt riche en lysines et ne fait pas partie des autres signaux. Toutes les autres protéines « *Rev-like* » des virus de la famille *Retroviridae* ont des domaines RBD démontrés ou prédits comme étant de type monopartite (voir Figure 5.1) (Mertz et al., 2005).

Il est important de préciser que l'identification des résidus qui composent le RBD de Rev du VIB a été réalisée de façon indirecte puisqu'on n'a pas mis en évidence une interaction directe entre la protéine Rev du VIB et son RRE, par exemple par la réalisation d'essais de liaison ARN-protéine *in vitro*. Toutefois, le système utilisé dans cette étude nous a permis à la fois d'observer la liaison à l'ARN (RRE) et la capacité d'exportation de l'ARN vers le cytoplasme *in vivo* (Gomez Corredor et Archambault, 2009).

Tous les mutants testés pour établir si les résidus mutés faisaient partie ou non du domaine RBD de la protéine Rev du VIB (voir Tableau 4.1) avaient deux caractéristiques importantes. Tous les mutants ont été localisés au noyau, et pour tous les candidats, le signal d'exportation ou NES (décrit dans le chapitre III) était intact, sans mutation, comme dans la protéine Rev sauvage du VIB. Ces deux conditions

nous ont permis de nous assurer que les protéines étaient capables d'aller au noyau pour rencontrer les ARNs et se lier sur le RRE, et une fois le complexe formé, de retourner vers le cytoplasme grâce à leur signal d'exportation ou NES. De cette façon, les résultats obtenus indiquent spécifiquement la capacité de liaison à l'ARN. Cependant, pour un des mutants testés, le mutant Mut 5, la perte d'activité ne peut pas être associée directement au manque de liaison à l'ARN (voir Figure 2.6 et 4.6). Ce mutant présente une substitution ⁸⁷R/A dans le NoLS, ce qui a résulté en l'absence de localisation de Rev au nucléole, même si la protéine était capable de d'entrer dans le noyau, comme observé dans les figures 2.5 et 4.5. Récemment, les études sur Rev du VIH-1 ont suggéré que la liaison de Rev au RRE ainsi que la multimérisation de Rev sur le RRE et l'assemblage du complexe d'exportation peuvent avoir lieu en même temps dans le nucléole (Daelemans et al., 2004; Daugherty, D'Orso et Frankel, 2008; Daugherty et al., 2010; Daugherty, Liu et Frankel, 2010). L'absence d'activité de Mut 5 ne peut donc pas être directement associée à l'absence de liaison à l'ARN.

Tel que mentionné auparavant, les résultats des résidus qui composent le RBD pourraient être confirmés par des expériences d'interaction directe ARN-protéines *in vitro* en utilisant des essais de retard sur gel ou EMSA « *electrophoretic mobility shift assay* » pour déterminer la capacité de liaison des différents mutants de Rev du VIB au RRE sauvage. Les différentes protéines mutantes devront être purifiées dans un système procaryote (comme celui utilisé dans le chapitre IV) alors que l'ARN du RRE sauvage pourrait être produit par transcription *in vitro* et marqué au ³²P. L'interaction entre le RRE et les différentes protéines Rev serait visualisée par la migration électrophorétique sur gel des complexes ARN-protéines.

Un autre objectif important pour des études futures est la caractérisation du RRE du VIB. La séquence du RRE du VIB est composée de 312 nucléotides (Molina et al., 2004). Cependant, rien n'est connu sur sa structure ou sur les acides nucléiques qui seraient importants pour l'interaction avec Rev du VIB. Chez le VIH-1, le site RRE a

été très bien caractérisé. Les études réalisées ont permis de démontrer qu'il y a une région de haute affinité qui permet la liaison d'une molécule de Rev (Tige IIB). Une fois que la première molécule est fixée, d'autres molécules (jusqu'à 13) de Rev peuvent se fixer sur le RRE dans des sites contigus de la région de haute affinité (Olsen et al., 1990; Madore et al., 1994; Mann et al., 1994). Ainsi, la séquence minimale nécessaire à la liaison de la protéine Rev du VIB au RRE pourrait être déterminée.

Pour caractériser la région du RRE du VIB nécessaire à la liaison de Rev, deux méthodologies pourraient être utilisées, l'une basée sur des délétions de la séquence du RRE, et une autre sur l'interaction Rev-RRE. Pour la première approche proposée, il faudra prédire la structure secondaire du RRE et générer des mutants selon les conformations possibles de la structure. Ainsi, les différents mutants RRE obtenus seraient utilisés pour réaliser la transcription *in vitro* et les ARN produits seraient marqués au ^{32}P . Des essais de liaison seraient ensuite réalisés avec la protéine Rev sauvage par la technique d'EMSA. Cette approche a été utilisée avec succès pour la détermination de la région RRE du VIH-1 nécessaire à l'interaction avec Rev (Kjems et al., 1991). La deuxième approche pour étudier la région du RRE du VIB qui interagit avec la protéine Rev implique l'essai de « *Dimethyl Sulfate (DMS) Footprinting* ». Cette technique permet l'identification des positions sur l'ARN qui sont importantes pour l'interaction ARN-protéine (Tijerina, Mohr et Russell, 2007). Le traitement au DMS modifie chimiquement l'ARN. Les positions de l'ARN qui sont en interaction avec la protéine sont soit protégées soit modifiées par le DMS, contrairement aux positions non protégées. L'ARN modifié par le DMS est ensuite extrait du complexe ARN-protéine et sert de matrice pour la réalisation d'une réaction d'extension d'amorce (avec une amorce radiomarquée). En parallèle, une réaction de séquençage par la méthode de Sanger doit être réalisée avec l'ARN non traité au DMS. Les réactions de séquençage et d'extension d'amorce sont déposées sur gel. Une comparaison de l'intensité des bandes est réalisée pour déterminer avec

l'aide de la réaction de séquençage les positions qui sont en contact avec la protéine (par la comparaison des puits avec seulement l'ARN-DMS et ARN/protéine/DMS). Ensuite, les positions identifiées par « *Footprinting* » et possiblement nécessaires pour l'interaction de la protéine Rev avec le RRE pourront être modifiées par mutagenèse dirigée. Des essais EMSA seraient ensuite réalisés pour confirmer si ces positions sont cruciales pour l'interaction Rev-RRE chez le VIB.

5.1.3 Le NES

Comme pour toutes les protéines Rev ou « *Rev-like* » de la famille *Retroviridae* caractérisées jusqu'à maintenant, la protéine Rev du VIB possède un signal d'exportation nécessaire à sa fonction de transport des ARN viraux du noyau vers le cytoplasme (Pollard et Malim, 1998; Suhasini et Reddy, 2009). Le signal d'exportation ou NES de la protéine Rev du VIB a été complètement identifié, tel que rapporté dans le chapitre III de cette thèse. Grâce à la méthodologie utilisée, la région et la composition exacte des résidus qui forment le NES ont été déterminées.

Les premières protéines dans lesquelles des signaux de type NES ont été caractérisées sont les protéines Rev du VIH-1 et PKI. Ces signaux sont riches en résidus leucine d'où le premier nom de domaine riche en leucines (Kutay et Guttinger, 2005; Ding et al., 2010). À partir de ces découvertes, deux signaux consensus ont été établis, un pour la protéine Rev du VIH-1 et un autre pour la protéine PKI (Fischer et al., 1995; Wen et al., 1995). Ces signaux sont composés de 4 résidus de type hydrophobe, principalement des leucines. Par contre des isoleucines, valines, méthionines ou phénylalanines peuvent être acceptés. La différence majeure entre les deux types de signaux est le nombre de résidus qui séparent les 4 résidus hydrophobes pour Rev du VIH-1 et pour PKI (Fischer et al., 1995; Wen et al., 1995). Cependant, une nouvelle classification des signaux de type NES a été présentée en 2010 dans laquelle 5 et non 4 résidus hydrophobes sont importants. Le type de résidu

y joue aussi un rôle clé (Guttler et al., 2010). Ainsi, le signal consensus de type NES du Rev du VIH-1 est formé de 5 résidus exclusivement de type leucine. Le signal de type PKI est également composé de 5 résidus, mais ils peuvent être des leucine, isoleucine, valine, méthionine, phénylalanine, tryptophane, tyrosine ou proline (Guttler et al., 2010). Selon cette classification, le signal NES de la protéine Rev du VIB caractérisé lors de ce projet est de type PKI et ainsi donne une autre caractéristique unique à la protéine Rev du VIB (voir Figure 3.8).

5.1.4 Le domaine de multimérisation

La multimérisation de Rev du VIH-1 est un processus important pour sa fonction. De fait, les dernières études ont démontré que la multimérisation, la liaison à l'ARN et l'assemblage du complexe d'exportation sont des événements clés pour la fonction de Rev du VIH-1. Les trois événements sont orchestrés et exécutés simultanément (Daugherty, D'Orso et Frankel, 2008; Daugherty et al., 2010; Daugherty, Liu et Frankel, 2010). Dans le chapitre IV de cette thèse, on a démontré que la protéine Rev du VIB était capable de multimériser *in vitro* et *in vivo* en absence du RRE (voir Figures 4.2 et 4.3). Comme pour la protéine Rev du VIH-1, on a démontré que deux régions dans la protéine Rev du VIB sont responsables de cette fonction (voir Figure 4.4), mais la séquence spécifique des résidus qui composent chacun des domaines de multimérisation reste à être déterminée.

Outre la protéine Rev du VIH-1, la multimérisation a été démontrée pour la protéine Rev du EIAV et les protéines “*Rev-like*” du HTLV-1 et du HERV-K (Bogerd et Greene, 1993; Harris et al., 1998; Boese et al., 2001). Des études de mutagenèse ont aussi été réalisées pour déterminer les régions impliquées dans la multimérisation des protéines Rex du HTLV-1 et Rec du HERV-K (Heger et al., 1998; Boese et al., 2001). Ainsi selon ces rapports, les protéines Rev du VIB, Rev du

VIH-1 et Rex du HTLV-1 ont des domaines de multimérisation de type bipartite (voir Figure 5.1).

Grâce à la méthodologie utilisée lors de ce projet, on a pu ainsi mettre en évidence que la protéine Rev du VIB était capable de multimériser dans le cytoplasme en l'absence du RRE. Il faudrait donc réaliser des études en utilisant des méthodologies comme le FRET « *fluorescence resonance energy transfer* » et le FRAP « *fluorescence recovery after photobleaching* » qui nous permettraient de déterminer si la protéine Rev est capable de multimériser dans le nucléole et dans le noyau, comme cela a été démontré pour la protéine Rev du VIH-1 (Fouts et al., 1997; Daelemans et al., 2004).

5.2 LA PROTÉINE REV ET LE NUCLÉOLE

Le nucléole a suscité dernièrement beaucoup d'intérêt. L'idée d'un organelle connue comme étant une machine à produire des ribosomes a substantiellement changé (Boisvert et al., 2007; Greco, 2009). Les dernières avancées en protéomique et en imagerie cellulaire sur des cellules HeLa humaines ont permis de déterminer que le nucléole est un réseau composé de plus de 4 500 protéines différentes (Ahmad et al., 2009). Ces protéines ont des rôles essentiels dans les différents processus cellulaires. Cependant, trois protéines sont présentes majoritairement dans le nucléole, soit la nucléoline, la B23 et la fibrillarine (Boisvert et al., 2007; Ahmad et al., 2009; Emmott et Hiscox, 2009). D'ailleurs, un champ de recherche en pleine expansion est l'implication du nucléole dans certaines infections virales. Plusieurs études ont démontré que les virus adressent spécifiquement au nucléole leurs acides nucléiques et leurs protéines nécessaires à des processus comme leur réplication. Cet adressage spécifique au nucléole a été démontré pour des virus de type ADN et ARN (Hiscox, 2007; Emmott et al., 2008; Sirri et al., 2008; Hiscox, Whitehouse et Matthews, 2010).

Un groupe de virus à ADN très étudié pour son interaction avec le nucléole est celui des herpesvirus. Des études sur le HSV-1 « *herpes simplex virus 1* », le CMV « *cytomegalovirus* » et l'EBV « *Epstein-Barr virus* » ont montré qu'au moins 12 protéines spécifiques virales se localisent au nucléole (Salsman et al., 2008). Les études réalisées avec le HSV-1 ont démontré que la localisation nucléolaire de la protéine virale ORF57 induit une redistribution au nucléole de la protéine cellulaire TREX « *transcription/export* » impliquée dans l'exportation des ARNm vers le cytoplasme (Boyne et Whitehouse, 2006). De plus, la même protéine dans le KSHV « *Kaposi's sarcoma associated herpesvirus* » induit la redistribution de la protéine PYM « *Partner of Y14-Mago* » au nucléole (cette protéine est impliquée dans l'amélioration (enhancement) de la traduction cellulaire). L'interaction entre ORF57 et PYM produit une augmentation des niveaux de traduction des ARNm viraux pendant l'infection de KSHV (Boyne et al., 2010). En plus de la relocalisation des protéines nucléaires ou cytoplasmiques au nucléole, le HSV-1 induit la dispersion nucléaire et cytoplasmique de protéines normalement localisées au nucléole. C'est le cas des protéines nucléoline et B23 qui sont dispersées par la protéine UL24 du HSV-1 (Lymberopoulos et Pearson, 2007; Lymberopoulos et al., 2011). Le rôle de cette dispersion n'est pas encore bien élucidé. Cependant, une étude récente dans laquelle la nucléoline endogène cellulaire a été réprimée (*knockdown*) a démontré que la dispersion de la nucléoline dans le cours de l'infection virale est un processus nécessaire pour la sortie efficace du noyau des nucléocapsides du HSV-1 (Sagou, Uema et Kawaguchi, 2010).

Les nidovirus et les rétrovirus sont des virus à ARN qui interagissent aussi avec le nucléole. La protéine N des coronavirus et des artérovirus (des nidovirus) se localise au nucléole. La protéine N est nécessaire à l'encapsidation du génome viral (Hiscox, Whitehouse et Matthews, 2010). Chez le rétrovirus, le VIH-1 utilise le nucléole dans trois processus clés de son cycle réplcatif : l'entrée du virus dans la cellule via des récepteurs membranaires, le passage de l'ARN viral et la transcription. La nucléoline,

bien qu'étant une des principales protéines nucléolaires, peut aussi être localisée dans la membrane cytoplasmique des cellules en phase de prolifération (Christian et al., 2003). Il a été démontré que la nucléoline membranaire peut servir de récepteur d'entrée pour plusieurs virus comme le HPIV-3 « *human parainfluenza virus type 3* », le virus de Coxsackie B et le virus du VIH-1 (de Verdugo et al., 1995; Nisole, Krust et Hovanessian, 2002; Bose, Basu et Banerjee, 2004; Said et al., 2005). De plus, les nucléoles des lymphocytes de patients VIH-1 positifs ont une structure anormale et présentent un haut niveau d'expression de la nucléoline au niveau de la membrane cellulaire (Galati et al., 2003). Il a été notamment démontré que les particules virales du VIH-1 se localisent sur la membrane cellulaire et induisent une agrégation de la nucléoline, utilisant ainsi cette voie pour entrer dans la cellule (Nisole, Krust et Hovanessian, 2002). Ces résultats ont été confirmés par l'utilisation d'un compétiteur qui mime une partie de la protéine gp120 et inhibe l'entrée du virus dans les cellules via la nucléoline (Greco, 2009).

Deux protéines régulatrices du VIH-1 se localisent au nucléole dans des cellules infectées ou dans les systèmes de surexpression des protéines Tat et Rev. Tat est la principale protéine trans-activatrice de la transcription virale. Elle est localisée au nucléole grâce à son interaction avec la protéine B23 et l'expression de Tat induit la relocalisation nucléolaire de deux protéines cytoplasmiques, la protéine HIC « *human I-mfa domain containing protein* » et la granuline. Ces protéines sont des régulateurs cellulaires de l'activité de Tat (Young et al., 2003; Gautier et al., 2005; Hoque et al., 2005). La protéine Rev du VIH-1 est aussi normalement localisée au nucléole où elle interagit aussi avec la protéine B23 (Fankhauser et al., 1991). Plusieurs études ont démontré que l'ARN viral passe par le nucléole pendant le cycle de réplication virale (Michienzi et al., 2000; Canto-Nogues et al., 2001). Comme il a été mentionné auparavant, Rev est impliqué dans le transport des ARN viraux. Des études avec la protéine Rev du VIH-1 fusionnée à la GFP « *green fluorescent protein* » pour des techniques de FRET et FRAP ont démontré que le mouvement de la protéine au

nucléole est très lent, impliquant l'interaction ou l'attachement de Rev à des protéines ou des acides nucléiques (Daelemans et al., 2004). Des études récentes ont également démontré que l'interaction de Rev avec le RRE, la multimérisation de Rev et l'assemblage du complexe d'exportation sont des processus étroitement liés qui sont probablement réalisés en même temps (Daugherty, D'Orso et Frankel, 2008; Daugherty et al., 2010; Daugherty, Liu et Frankel, 2010). Finalement, il a été démontré que l'assemblage du complexe d'exportation Rev:CRM 1 est réalisé au nucléole (Daelemans et al., 2005). Cependant, le rôle exact de la localisation de Rev au nucléole pendant l'infection par VIH-1 reste à déterminer.

La protéine Rev du VIB se localise dans le nucléole grâce à un nouveau signal NoLS qui est indépendant du NLS (voir chapitre 2) (Gomez Corredor et Archambault, 2009). Cette indépendance entre les signaux NLS et NoLS est très importante parce qu'elle permet de réaliser des études chez des virus où seulement le signal NoLS est affecté. Comme indiqué précédemment, la protéine Rev du VIH-1 a aussi un signal NoLS qui se trouve dans la même région où on retrouve le NLS et le domaine RBD. Ainsi, générer des virus mutants dans lesquels seulement ce signal est affecté et non les autres est pratiquement impossible chez le VIH-1, alors que c'est clairement réalisable avec la protéine Rev du VIB. Le but d'un tel travail serait d'établir la relation entre le NoLS, nucléole et cycle de réplication virale en égard d'une protéine Rev lentivirale.

Comme travaux futurs, il faudrait d'abord confirmer les résultats obtenus par microscopie confocale. Comme démontré dans la figure 2.1 panel B, la protéine Rev du VIB colocalise avec la nucléoline et la protéine B23, deux des principales protéines nucléolaires. Il serait intéressant de déterminer si cette colocalisation de la protéine Rev du VIB peut être le résultat d'une association ou de l'interaction directe avec la nucléoline et/ou B23. Des résultats de co-immunoprécipitation préliminaires obtenus pendant la réalisation du projet tendaient à montrer que la protéine Rev du

VIB peut être associée à la protéine B23 (non montrés). Il faudrait ainsi confirmer ces résultats par co-immunoprécipitation dans des cellules surexprimant la protéine Rev du VIB et en utilisant des anticorps (monoclonaux ou polyclonaux) dirigés contre les protéines nucléoline et B23 endogènes ainsi que contre la protéine Rev du VIB. Si l'association observée avec la protéine B23 est confirmée, des essais de GST pull down pourraient être réalisés pour confirmer l'interaction directe entre les deux protéines. Finalement, en utilisant les mutants générés pour identifier le signal NoLS (voir Figure 2.5), il serait possible de mettre en évidence le fait que l'interaction entre les protéines Rev du VIB et B23 est réalisée via le NoLS.

Une étude récente avec le virus PRRSV « *Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus* » qui appartient au groupe des artérovirus a donné des résultats très prometteurs (Pei et al., 2008). Ce groupe de chercheurs a démontré que la simple mutation du NLS de la protéine N, qui normalement se localise au nucléole, avait un impact direct sur l'infection chez le porc, l'hôte naturel de l'infection. L'étude a en effet démontré que les porcs infectés avec le virus muté pour le NLS avaient moins de virémie, une augmentation des anticorps neutralisants et une durée de l'infection plus courte en comparaison au virus sauvage (Pei et al., 2008).

Une étude comme celle réalisée par Pei et al, est difficilement réalisable dans le contexte de l'infection par VIB chez l'hôte naturel, de par la nature de l'infection et surtout de l'absence de manifestations cliniques notables. Toutefois, une étude dans les cellules naturellement infectées peut être réalisée en exploitant le fait que les NLS et NoLS sont indépendants chez la protéine Rev du VIB. Il faudrait générer, en utilisant un clone infectieux, un virus mutant du VIB pour lequel la localisation au nucléole de la protéine Rev serait affectée par une mutation dans le NoLS sans affecter l'activité d'exportation ni celle de liaison à l'ARN. Le mutant Mut 3 (voir Figures 2.5 et 2.6) est un bon candidat afin d'assurer le développement d'un VIB mutant. Une fois le virus mutant généré, des infections dans des cellules permissives

comme les fibroblastes de poumon fœtal ou des macrophages bovins pourraient être réalisées. En parallèle, des infections avec le virus sauvage devront être réalisées. Ainsi, la production de la protéine p26, l'activité RT et/ou la libération des virions par microscopie électronique pourraient être évaluées pour déterminer l'impact de l'absence de localisation au nucléole de Rev dans le cycle viral du VIB.

Pour déterminer le rôle possible du nucléole dans l'infection par le VIB, et peut-être aussi par le VIH-1, une approche utilisée récemment pourrait être préconisée. Dans cette étude, l'expression endogène de la protéine nucléoline a été considérablement inhibée par l'utilisation de lignées cellulaires (cellules Vero) qui exprimaient de manière stable des ShRNA « *small harpin RNA* » dirigés contre la nucléoline. Ces cellules ont été par la suite infectées par le virus HSV-1 (Sagou, Uema et Kawaguchi, 2010). Fait intéressant, l'inhibition de l'expression n'a pas eu d'effet sur la survie de la cellule malgré le fait que la nucléoline est une protéine majoritaire au nucléole et qu'elle participe dans des processus physiologiques importants de la cellule (Mongelard et Bouvet, 2007). Il faudrait d'abord tester si l'expression de la protéine B23 peut aussi être inhibée dans des lignées cellulaires susceptibles à l'infection par le VIB et par le VIH-1 sans avoir des effets négatifs sur la croissance de la cellule, comme il a été démontré pour la nucléoline. Une fois les lignées cellulaires établies, une infection avec des particules infectieuses de VIB ou VIH-1 serait réalisée et des tests pour déterminer le cours de l'infection telle que décrits ci-haut seraient utilisés pour démontrer les effets possibles de l'inhibition de l'expression de B23 sur le cycle viral. Cette approche ne permettrait pas de mettre en évidence l'effet direct de la non interaction de la protéine Rev avec la protéine B23. Cependant, elle pourrait donner des indices sur le rôle du nucléole pendant l'infection par le VIB ou le VIH-1.

5.3 LE VIB COMME UN MODÈLE D'ÉTUDE DES LENTIVIRUS NON PATHOGÈNES

Les lentivirus affectent une grande variété d'animaux, avec des maladies avec un haut taux de morbi-mortalité comme le SIDA chez l'homme ou encore des infections asymptomatiques et subcliniques comme le VIB chez les bovins (Corredor, St-Louis et Archambault, 2010). Ces différences au niveau de la sévérité des symptômes associés aux infections lentivirales ont été expliquées par différents facteurs reliés non seulement au type de virus mais aussi à des facteurs cellulaires qui vont aider ou bloquer l'infection virale (Strebel, Luban et Jeang, 2009; Chakrabarti et Simon, 2010). Les nouvelles études sur la protéine Rev du VIH-1 ont montré que celle-ci ne doit plus être considérée comme une protéine accessoire seulement mais plutôt comme une protéine majeure impliquée dans le processus infectieux du virus. Les caractéristiques spéciales de Rev du VIB mises en évidence dans ce projet ouvrent la porte à l'évaluation de la possibilité que des différences fonctionnelles, par rapport à Rev du VIH-1, puissent être des facteurs additionnels à ceux déjà connus pour expliquer la grande différence pathogénique entre les deux virus.

La protéine Rev des lentivirus joue des rôles primordiaux pendant la phase initiale de l'infection et sa fonction ne se limite pas ainsi seulement à la phase tardive. La mise en évidence du rôle de Rev dans l'inhibition de l'intégration de l'ADN proviral au début de l'infection supporte cette affirmation (Levin et al., 2009a; Levin et al., 2009b). Ce rôle de Rev est en fait essentiel pour éviter une augmentation des événements d'intégration qui pourrait résulter en une situation de génotoxicité conduisant à la mort de la cellule (Grewe et Uberla, 2010). Normalement, une cellule infectée par le VIH-1 a un nombre très limité d'événements d'intégration par cellule qui n'excède pas deux (Butler, Hansen et Bushman, 2001) même si elle dispose d'au moins 20 copies d'ADNc viral (Butler, Hansen et Bushman, 2001; Wu, 2008). En effet des tests d'infection avec des virus déficients en Rev ont montré un taux élevé

des événements d'intégration sans production de virions infectieux et une mort cellulaire de près de 40% (Levin et al., 2009a). Un fait à remarquer est qu'il existe des différences importantes entre le nombre de copies d'ADN proviral qui est intégré entre les différents membres de la famille *Retroviridae*. À l'opposé, des virus comme le MuLV « *Moloney Murine Leukemia Virus* » ou le virus RSV « *Rous sarcoma virus* » ont entre 9 à 14 et 4 à 6 événements d'intégration par cellule, respectivement. Ces virus sont des rétrovirus simples qui ne produisent pas d'homologues de la protéine Rev (Levin et al., 2009b). Prises dans l'ensemble, ces observations indiquent que les lentivirus complexes ont mis en place un mécanisme très sophistiqué pour contrôler ces événements d'intégration.

Il serait donc intéressant de déterminer si la protéine Rev du VIB a un rôle dans l'inhibition de la fonction d'intégration dans le cours de l'infection. Pour ce faire, il faudrait déterminer si Rev du VIB est capable d'interagir séparément avec l'IN du VIB et aussi avec la protéine LEDGF/p75, un co-facteur de l'IN du VIH-1 (Engelman et Cherepanov, 2008) et du VIB (Cherepanov, 2007). Si une telle interaction existe, il faudrait déterminer si Rev du VIB affecte l'intégration par le blocage du complexe IN-LEDGF/p75, comme cela a été démontré pour Rev du VIH-1. Par la suite, il faudrait utiliser un virus du VIB délété pour la fonction Rev pour pouvoir confirmer s'il existe une relation directe entre la présence de Rev et l'augmentation ou non des événements d'intégration et la mortalité cellulaire, comme c'est le cas avec Rev du VIH-1 (Levin et al., 2009a; Levin et al., 2009b; Grewe et Uberla, 2010; Levin et al., 2010a). Le scénario par lequel l'inhibition de l'intégration par Rev n'existerait pas dans le processus infectieux du VIB, pourrait signifier que l'infection par le VIB est moins efficace que celle associée au VIH-1, pouvant alors résulter en une moins grande pathogénicité comparativement au VIH-1.

5.4 UN NLS MONOPARTITE VERSUS UN NLS BIPARTITE : UNE DIFFÉRENCE PENDANT LE PROCESSUS D'INFECTION DES LENTIVIRUS ?

Un facteur important à considérer dans les différences fonctionnelles entre les protéines Rev du VIH-1 et du VIB est leur capacité d'atteindre le noyau et les mécanismes employés pour y arriver. La protéine Rev du VIH-1 a mis en place un mécanisme très diversifié pour l'importation au noyau par la mise en évidence d'au moins cinq importines de la famille de karyophérines β (importine β , transportine, importine 5, importine 7 et importine 9). Ces importines sont associées à des voies de transport nucléaire différentes de celle de la voie classique, chacune interagissant *in vitro* directement avec Rev du VIH-1 (Arnold et al., 2006). Deux études récentes ont démontré qu'au moins deux importines, l'importine β et la transportine sont impliquées dans le transport *in vivo* de la protéine Rev en fonction du type cellulaire utilisé (Hutten et al., 2009; Gu et al., 2011). Toutefois, il reste à déterminer la possibilité que Rev du VIH-1 puisse utiliser d'autres récepteurs *in vivo* différents de l'importine β et de la transportine (Gu et al., 2011).

En s'appuyant sur le fait que Rev du VIH-1 a possiblement la capacité d'interagir avec de multiples récepteurs, l'utilisation de plusieurs voies d'importation est sans aucun doute un avantage pour la fonction de Rev dans le développement du processus infectieux du VIH-1. L'utilisation de multiples voies d'importation nucléaire a été mise à profit par d'autres protéines pour faciliter et mieux accomplir leurs différents rôles, les histones cellulaires et les protéines virales comme l'intégrase du VIH-1 ou la protéine VII du core des adénovirus étant de bons exemples (Muhlhauser et al., 2001; Wodrich et al., 2006; Levin et al., 2010c). D'ailleurs, comme mentionné dans la discussion du Chapitre III, la polymérase du virus de l'influenza a la capacité d'adapter ses mécanismes d'importation en fonction de l'espèce. Cette capacité

d'adaptation permet la transmission du virus entre les espèces et en plus module la pathogénicité virale (Gabriel et al., 2011).

Comme il a été démontré dans le chapitre III de cette thèse, la protéine Rev du VIB a un mécanisme d'importation au noyau différent de celui de Rev du VIH-1. La protéine Rev du VIB n'interagit pas *in vitro* directement avec l'importine β et son transport est réalisé par la voie classique d'importation en utilisant l'importine α . Cette étude a été réalisée avec un système d'importation *in vitro* en utilisant des cellules HeLa qui sont un modèle standard pour ce type d'expérience (Adam, Marr et Gerace, 1990). Cependant, des questions restent ouvertes à savoir si d'autres récepteurs sont impliqués, ou encore si le mécanisme d'importation par la voie classique est aussi utilisé dans des cellules permissives pour l'infection et dans les cellules infectées naturellement par le virus.

La première question est en partie éclaircie. Tous les récepteurs nommés ci-dessus qui interagissent avec la protéine Rev du VIH-1 appartiennent à la famille des karyophérines β , et à l'exception de la transportine, l'interaction entre les différents récepteurs et la protéine Rev du VIH-1 se fait par l'intermédiaire du NLS (Arnold et al., 2006). Les importines de la famille des karyophérines β interagissent directement avec les protéines qui seront transportées par une voie différente de la voie classique, via les NLSnc de type monopartite comme celui de la protéine Rev du VIH-1 (Stewart, 2007; Chook et Suel, 2010). Les protéines avec un NLSc bipartite comme celui de la nucléoplasmine interagissent plutôt avec l'importine α et sont transportées par la voie classique (Stewart, 2007). Tel que démontré dans le chapitre II de cette thèse, la protéine Rev du VIB a un NLS bipartite atypique (possèdent 20 aa dans sa séquence « *spacer* »), et est transportée au noyau via la voie classique. Ceci est conforme à une étude où l'intégrase du rétrotransposon Ty1 contenant aussi un NLSnc bipartite avec une séquence « *spacer* » de 29 résidus est transportée au noyau via la voie classique d'importation (McLane et al., 2008).

La question d'une interaction possible de la protéine Rev du VIB avec la transportine reste à éclaircir. La transportine reconnaît des NLS du type PY-NLS (Chook et Suel, 2010) mais des protéines comme Rev du VIH-1 qui ne contiennent pas ce type de signal sont transportées par la transportine (Hutten et al., 2009). Ceci indique que la transportine doit reconnaître d'autres régions dans la protéine qui sont différentes du PY-NLS. Un mécanisme d'interaction a été proposé par lequel la transportine interagit avec les complexes homo-multimériques que peut former la protéine Rev du VIH-1 et non avec des monomères de Rev (Arnold et al., 2006). Comme ce fut démontré dans le chapitre IV, la protéine Rev du VIB est aussi capable de former des complexes homomultimériques *in vivo* et *in vitro*. Il faudra confirmer, par des interactions directes protéine-protéine *in vitro* et *in vivo*, que la protéine Rev du VIB a ou non la capacité d'interagir avec la transportine et d'autres transporteurs importants de la famille des karyophérines β mentionnés auparavant.

Tel que mentionné auparavant, il faudra démontrer que la voie d'importation classique mise en évidence dans cette étude est utilisée aussi dans des cellules permissives et/ou naturellement infectées par le VIB. Il faudrait réaliser des études d'importation *in vitro* en utilisant toutefois ces types cellulaires et/ou en remplaçant le lysat de réticulocyte de lapin, utilisé lors de notre étude, par des extraits de cytosol spécifiques pour chaque lignée cellulaire (Gu et al., 2011). Pour confirmer la voie d'importation classique dans ces cellules perméabilisées (permissives et naturellement infectées) à la digitonine, il serait intéressant d'utiliser des compétiteurs non marqués de la voie classique d'importation, comme le NLS de l'antigène T du SV40 fusionné à la BSA, pour confirmer l'importation via la voie classique. De plus, il faudrait réaliser des tests *in vivo* en faisant des transfections pour surexprimer la protéine Rev du BIV et en utilisant par exemple la technologie de siRNA pour bloquer l'importine α . Une compétition par co-transfection cellulaire avec le NLS du SV40 est aussi envisageable.

Finalement, il serait intéressant de tester si le changement du NLS bipartite de la protéine Rev du VIB par le NLS monopartite du VIH-1 et de son RRE correspondant pourrait avoir un effet sur la capacité de réplication et d'infectivité du virus *in vitro*. De telles expériences aideront à confirmer la théorie que la protéine Rev pourrait avoir un rôle dans les différences pathogéniques des différents lentivirus, en l'occurrence le VIH-1 et le VIB.

CONCLUSION

Les travaux réalisés dans la cadre de cette thèse ont permis de caractériser moléculairement et biologiquement la protéine Rev du VIB et d'établir que cette protéine est unique chez les lentivirus/rétrovirus. Cette particularité pourrait contribuer à expliquer les profondes différences qui existent chez les lentivirus en égard de leurs processus pathogéniques, tout particulièrement à ceux associés au VIH-1 qui est hautement pathogénique et au VIB qui est non ou peu pathogénique.

Tel que montré dans la Figure 5.2, nous avons pu identifier les principaux domaines fonctionnels de la protéine Rev du VIB. Au début de cette thèse, rien n'était connu par rapport à la composition et la localisation des domaines fonctionnels de la protéine Rev du VIB.

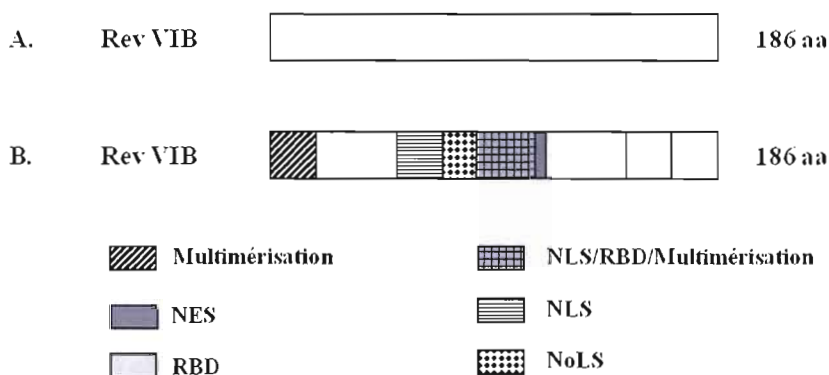


Figure 5.2 Domaines fonctionnels de la protéine Rev du VIB. A. Domaines fonctionnels connus au début de cette thèse. B. Domaines fonctionnels caractérisés au cours de la réalisation de cette thèse. Domaine de liaison à l'ARN (RBD), signaux de localisation nucléaire (NLS) et nucléolaire (NoLS) et domaine d'exportation du noyau (NES)

Nous avons identifié les NLS et NoLS de la protéine Rev du VIB. Nous avons démontré que le NLS de la protéine Rev du VIB est du type bipartite. Ce type de NLS

est le premier à être identifié dans la famille des protéines Rev ou “*Rev-like*” des lentivirus/rétrovirus. Nous avons également déterminé que le NoLS de Rev du VIB est aussi unique et diffère des séquences consensus de NoLS rapportées pour d'autres protéines virales et/ou cellulaires, peu importe leur nature.

Nous avons aussi caractérisé les voies d'importation et d'exportation au noyau de la protéine Rev du VIB (voir Figure 5.3). Nous avons démontré que la protéine Rev du VIB est importée par la voie classique et que les importines $\alpha 3$ et $\alpha 5$ sont impliquées. Nous avons aussi localisé et identifié le domaine d'exportation ou NES de la protéine Rev du VIB en démontrant que le mécanisme d'exportation était CRM1-dépendant. Nous avons également conclu que le NES de la protéine Rev du VIB appartient au groupe de PKI NES et non à celui de Rev VIH-1 NES, ce qui n'était pas encore rapporté chez les lentivirus.

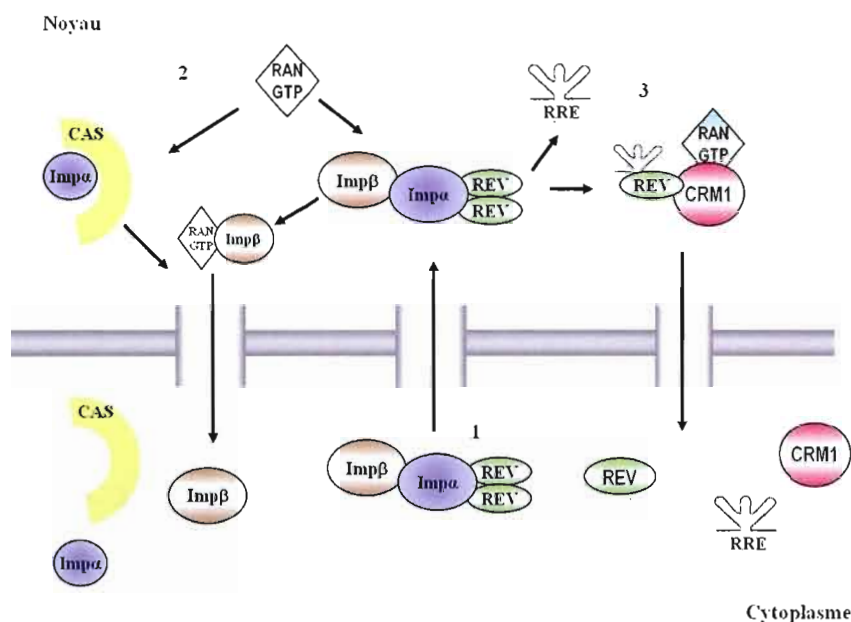


Figure 5.3 Cycle de transport de la protéine Rev du VIB. Le cycle est séparé en 3 étapes : 1. Rev peut multimeriser dans le cytoplasme et son NLS est reconnu par l'importine α , soit $\alpha 3$ ou $\alpha 5$. Une fois ce complexe formé, l'importine β , reconnaît aussi un NLS dans l'importine α et le complexe Rev-importine α -importine β est transporté au noyau. 2. Dans le noyau, l'interaction de RanGTP avec l'importine β

induit la libération du complexe Rev-importine α -importine β . L'exportine CAS forme un complexe avec l'importine α à l'aide de RanGTP. De la même façon, l'importine β forme un complexe avec RanGTP pour permettre son exportation via le NPC pour recommencer un nouveau cycle de transport. **3.** Au noyau, la protéine Rev reconnaît les ARNs viraux qui contiennent le RRE et l'exportine CRM1 forme un complexe avec Rev-RRE par intermédiation du NES de Rev à l'aide aussi de RanGTP. Une fois dans le cytoplasme, le complexe est dissocié, les ARNs seront traduits et finalement, Rev et CRM1 sont transportés au noyau pour effectuer un nouveau cycle.

Finalement, pour compléter la caractérisation, nous avons observé que Rev du VIB était capable de multimériser *in vitro* et *in vivo* dans le cytoplasme et que deux régions sont responsables de cette fonction. En plus, nous avons cartographié un domaine RBD bipartite chez Rev du VIB. Nous avons démontré que le premier motif du RBD était situé dans la région centrale de la protéine et chevauchait le NoLS et le NLS bipartite alors que le deuxième motif était situé à l'extrémité C-terminale de la protéine Rev du VIB.

En conclusion, l'ensemble des travaux présentés dans cette thèse de doctorat a permis la caractérisation des domaines fonctionnels de la protéine Rev du VIB. Les résultats ont clairement démontré que la protéine Rev du VIB est unique chez les lentivirus et les rétrovirus. Les résultats obtenus contribueront à mieux connaître la biogenèse du VIB et d'une manière plus générale des lentivirus, en égard des mécanismes de réplication et de pathogénicité de ces virus.

APPENDICE A: PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES

MOLECULAR AND BIOLOGICAL ASPECTS OF THE BOVINE IMMUNODEFICIENCY VIRUS

Andrea Gomez Corredor, Marie-Claude St-Louis and Denis Archambault

Département des Sciences Biologiques,
Université du Québec à Montréal, Québec, Canada

Article revue publié dans *Current HIV Research*, 2010, Janvier 8, 2-13

ABSTRACT

The bovine immunodeficiency virus (BIV) was isolated in 1969 from a cow, R-29, with a wasting syndrome suggesting bovine leucosis. The virus, first designated bovine visna-like virus, remained unstudied until HIV was discovered in 1983. Then, it was demonstrated in 1987 that the bovine R-29 isolate was a lentivirus with striking similarity to the human immunodeficiency virus (HIV). Moreover, BIV has the most complex genomic structure among all identified lentiviruses shown by several regulatory/accessory genes encoding proteins, some of which are involved in the regulation of virus gene expression. This manuscript aims to review biological and molecular aspects of BIV, with emphasis on regulatory/accessory viral genes/proteins which are involved in virus expression.

INTRODUCTION

Retroviruses are known to infect several animal species covering a large taxonomic range. All retroviruses have the common requirement for synthesizing a DNA copy of their RNA genome by the reverse transcriptase during their replicative life cycle (Goff, 2007). Lentiviruses belong to a unique genus of retroviruses which share

common structural, genetic, biological and/or pathological properties. Lentiviruses include human immunodeficiency virus (HIV), simian immunodeficiency virus (SIV), feline immunodeficiency virus (FIV), maedi-visna virus (MVV) in sheep, caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV), equine infectious anemia virus (EIAV), Jembrana disease virus (JDV) in cattle and bovine immunodeficiency virus (BIV) (Table 1). Although lentiviruses are considered exogenous and horizontally transmitted agents, the presence of an endogenous lentivirus was recently discovered in the genome of the gray mouse lemur (*Microcebus murinus*), a strepsirrhine primate from Madagascar, demonstrating that lentiviruses are capable of invading the primate germ line (Gifford et al., 2008).

Lentiviruses are not oncogenic. They also share a relatively long incubation period followed by a protracted symptomatic phase even though the host responds immunologically (Desrosiers, 2007). Chronic and degenerative pathologic changes, often associated to the development of immune-mediated lesions in infected host, are also characteristic of lentivirus infections (Desrosiers, 2007). Changes in the antigenic properties of viral envelope proteins of HIV, MVV and EIAV occur during the disease process, enabling the virus to escape the host immune response (Narayan et al., 1981; Payne et al., 1987; Burns et Desrosiers, 1994; Borrow et al., 1997). All lentiviruses infect monocyte/macrophage cells (Carter et Ehrlich, 2008). In addition, FIV, SIV and HIV infect T-cells and, consequently, are mainly associated with clinical signs of immunodeficiency in the infected hosts (Moanna et al., 2005; VandeWoude et Apetrei, 2006; Terzieva, 2008). As opposed to other retroviruses, lentiviruses may replicate in non-dividing cells. In addition, the lentivirus genome offers a complex structure including several regulatory/accessory genes that encode proteins, some of which are involved in the regulation of virus gene expression. This paper complements our earlier review on BIV (St-Louis, Cojocariu et Archambault, 2004) and focuses on biological and molecular properties of BIV, with emphasis on regulatory/accessory viral genes/proteins.

HISTORY OF BOVINE LENTIVIRUSES

In 1969, progressive deterioration of an 8-year-old pregnant dairy cow, named R-29, showing clinical signs of elevated white blood cell counts, lymphadenopathy, neurological disorders consistent with central nervous system lesions, progressive weakness and emaciation was reported (Malmquist, Van der Maaten et Boothe, 1969). Lymphadenopathic lesions and leucocytosis persisting for several months were observed in colostrum-deprived calves inoculated with the virus (Van der Maaten, Malmquist et Cheville, 1972). Histopathological analyses revealed follicular hyperplasia in the lymph nodes and the presence of infiltrating mononuclear cells within the brain tissues of these calves (Van der Maaten, Malmquist et Cheville, 1972). The virus was designated bovine visna-like virus and remained unstudied until HIV was discovered in 1983 (Barre-Sinoussi et al., 1983). Then, it was demonstrated that the bovine R-29 isolate was indeed a lentivirus with striking similarity to HIV type 1 (HIV-1) (Gonda et al., 1987). Consequently, the designations of the bovine immunodeficiency-like virus and, then, bovine immunodeficiency virus were used thereafter.

Most pathological, serological and molecular biology informations were obtained from studies of the original BIV R-29 isolate. Moreover, another bovine lentivirus, the Jembrana disease virus (JDV), was described, the genome of which showed a low identity level (74%) with that of BIV R-29 (Chadwick et al., 1995a). In addition, JDV causes an unusual clinical disease in Balinese cattle characterized with signs of fever, lethargy, anorexia and enlargement of the lymph nodes, and death of a significant number of infected animals within 1 to 2 weeks after infection (Chadwick et al., 1995b; Wilcox, Chadwick et Kertayadnya, 1995; Wareing et al., 1999). JDV is covered in details by Desport et al. in an accompanying paper of this journal issue.

SEROPREVALENCE AND CLINICAL/PATHOLOGICAL FEATURES OF BIV

BIV is distributed world-wide as it was serologically detected in Europe, Asia, India, Australia, New Zealand and North and South America (St-Louis, Cojocariu et Archambault, 2004; Bhatia et al., 2008; Gonzalez et al., 2008). BIV is pathologically more related to lentiviruses associated to chronic inflammatory diseases (CAEV and EIAV) as compared to those associated with severe immunodeficiency (HIV, FIV and SIV). The impact of BIV infection in cattle has never been clearly established as most infections occur with no evidence of clinical disease. BIV replicates in monocyte/macrophage cells with a possible dysfunction of the immune system (Carpenter et al., 1992; Onuma et al., 1992; Zhang et al., 1997b). This assumption is consistent with the fact that several secondary conditions including mastitis, pododermatitis and other bacterial diseases are associated with BIV infection, suggesting a possible impact on general health condition and dairy herd productivity (McNab, Jacobs et Smith, 1994; Jacobs et al., 1995). Moreover, reduction of *in vitro* lymphoproliferative responses to specific antigens or to mitogens [phytohemagglutinin (PHA), concanavalin A (Con A) and pokeweed (PWM) mitogen] was demonstrated with mononuclear cells isolated from cattle or sheep experimentally exposed to BIV (Martin et al., 1991; Hirai et al., 1996; Zhang et al., 1997b). Studies in rabbits experimentally infected by BIV described the development of a disease characterized by a fatal dysfunction of the immune system similar to that observed in humans, monkeys and cats infected with HIV-1 or HIV-2, the simian immunodeficiency virus (SIV) and the feline immunodeficiency virus (FIV), respectively (Kalvatchev et al., 1995; Kalvatchev et al., 1998).

Table 1. Clinical/Pathological Manifestations of Lentiviruses

| Lentivirus | Host | Clinical/Pathological Disorders |
|---|-----------------|--|
| Bovine immunodeficiency virus (BIV) | Cattle | Lymphocytosis, lymphadenopathy, opportunistic infections, central nervous system lesions, weakness, emaciation |
| Jembrana disease virus (JDV) | Balinese cattle | Fever, lethargy, anorexia and lymphadenopathy |
| Human immunodeficiency virus (HIV) | Human | Immunodeficiency, lymphadenopathy, opportunistic infections, encephalopathy, Kaposi's sarcoma |
| Feline immunodeficiency virus (FIV) | Cat | Immunodeficiency, lymphadenopathy, leucopenia, anemia, opportunistic infections |
| Simian immunodeficiency virus (SIV) | Primates | Immunodeficiency, neuropathology, opportunistic infections in rhesus macaque |
| Maedi-Visna virus (MVV) | Sheep | Encephalitis, pneumonia, lymphadenopathy, paralysis, opportunistic infections |
| Caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV) | Goat | Arthritis, encephalitis, paralysis |
| Equine infectious anemia virus (EIAV) | Horse | Hemolytic anemia, lymphoproliferation, glomerulonephritis, encephalopathy |

TRANSMISSION AND CELL TROPISM OF BIV

BIV is transmitted vertically in utero, or horizontally by the exchange of body fluids including blood and colostrum (Nash, Hanson et St Cyr Coats, 1995b; Moore, Keil et Coats, 1996; Snider et al., 1997; Venables et al., 1997; Munro et al., 1998; Meas et al., 2002; Moody et al., 2002). BIV proviral DNA was detected *in vivo* among a large variety of bovine tissues including brain, lungs, lymph nodes, spleen, peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and semen of infected animals (Gonda et al., 1990; Pifat et al., 1992; Baron et al., 1995; Nash, Hanson et St Cyr Coats, 1995b; Zhang et al., 1997a; Gradil et al., 1999).

BIV replicated *in vitro* in bovine, ovine, rabbit and canine cells and induced a cytopathic effect characterized by the formation of syncytia in permissive cells (Bouillant, Ruckerbauer et Nielsen, 1989; Gonda et al., 1990; Zhang et al., 1997a). However, virus gene expression varies widely according to the cell type, suggesting that specific cellular factors are required for productive infection (Fong et al., 1997; Kempster, Collins et Brownlie, 2002).

MORPHOLOGY OF BIV

BIV and HIV have a similar morphology and virions of comparable size of 120-130 nm. The bi-layer viral envelope is made of the viral surface (SU) gp100 and transmembrane (TM) gp45 proteins and encompasses lentivirus-typical conical-shaped capsid (CA) and nucleocapsid (NC) structures protecting the BIV genome. The genome is composed of a capped and polyadenylated diploid RNA of 8,482 nucleotides (nt) in length closely associated to viral proteins p7 and p14 (Gonda et al., 1994; St-Louis, Cojocariu et Archambault, 2004).

BIV GENOMIC ORGANIZATION AND GENE EXPRESSION

BIV has the most complex genome of the non-primate lentiviruses. The BIV proviral DNA is 8960 nt (for the described BIV127 molecular clone) long and is similar to other retroviruses with the typical 5' – 3' *gag*, *pol* and *env* structural gene organization (Fig. 1). The BIV genome includes, between or overlapping the *pol* and *env* reading frames, additional open reading frames (Orfs) that may encode non-structural regulatory/accessory proteins (Gonda et al., 1994; St-Louis, Cojocariu et Archambault, 2004). These Orfs are designated *vif* (viral infectivity factor), *tat* (trans-activator factor of transcription), *rev* (regulator of virus expression), *vpw*, *vpy*, and *tmx*. However, the Tat and Rev proteins were only shown to regulate viral expression at the transcriptional and post-transcriptional levels, respectively (Gonda et al., 1987; Garvey et al., 1990; Oberste et al., 1993; Gonda et al., 1994).

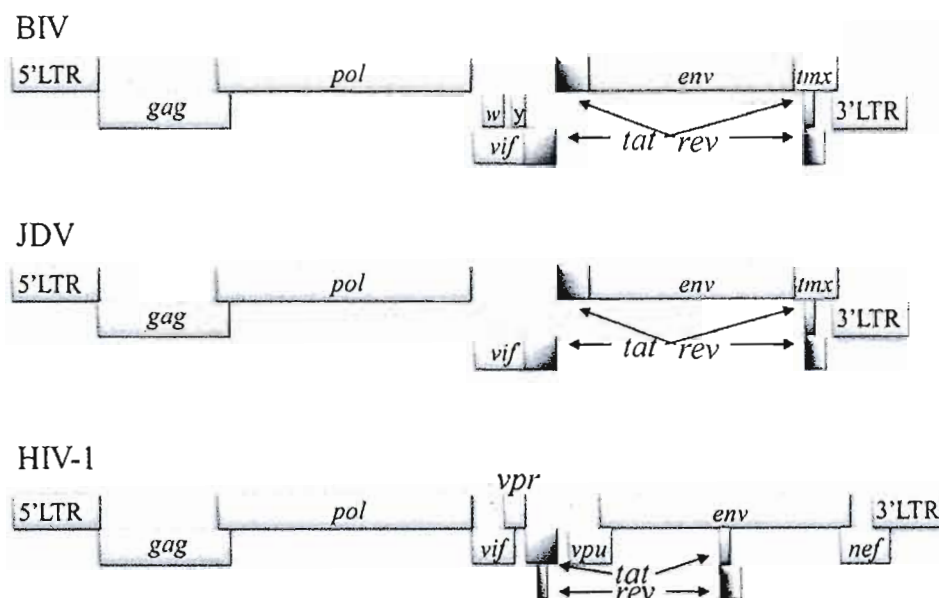


Fig. (1). Comparison of the proviral genomes of bovine immunodeficiency virus (BIV), Jembrana disease virus (JDV) and human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1), with the typical retroviral *gag*, *pol* and *env* gene organization, and the presence of LTRs. The regulatory/accessory genes identified in BIV are *vif*, *tat*, *rev*, *vpy* (y), *vpw* (w), and *tmx*.

The BIV proviral genome has two flanking sequences, the so-called long terminal repeats (LTRs) that play a key role in the regulation of viral replication and gene expression (Gonda et al., 1994). The organization of LTR in BIV genome is similar to other retroviruses as it includes the typical U3, R and U5 regions in the 5' – 3' direction. These LTRs are made during the reverse transcription of genomic RNA. The BIV LTR has 587 to 589 nucleotides (nt) (according to the BIV127 and 106 molecular clones, respectively) (Garvey et al., 1990). The LTR U3 region of BIV includes several nucleic acid binding sites for eukaryotic transcription factors such as NF- κ B, GRE, AP-1, AP-4, CAAT, ATF/CRE, TATA and SP1 (Fig. 2). All these elements are essential for the activity of BIV LTR (Garvey et al., 1990; Fong et al., 1995). In addition, the U3 region includes the initiation, enhancement and termination signals of transcription. Transcription initiation begins at +1 in the BIV sequence which marks the U3-R junction within the LTR (Gonda et al., 1994). The R region

has the essential sequences for the synthesis of the transactivation responsive (TAR) element, a harpin RNA sequence located at the 5' termini of all viral RNA transcripts (Chen et Frankel, 1994). The Tat protein binds to TAR and enhances the expression of other viral genes (see below). Finally, all viral RNAs have an untranslated common leader sequence at their respective 5' termini and a polyadenylated tail at the 3' terminal that is transcribed from the 3' LTR (St-Louis, Cojocariu et Archambault, 2004).

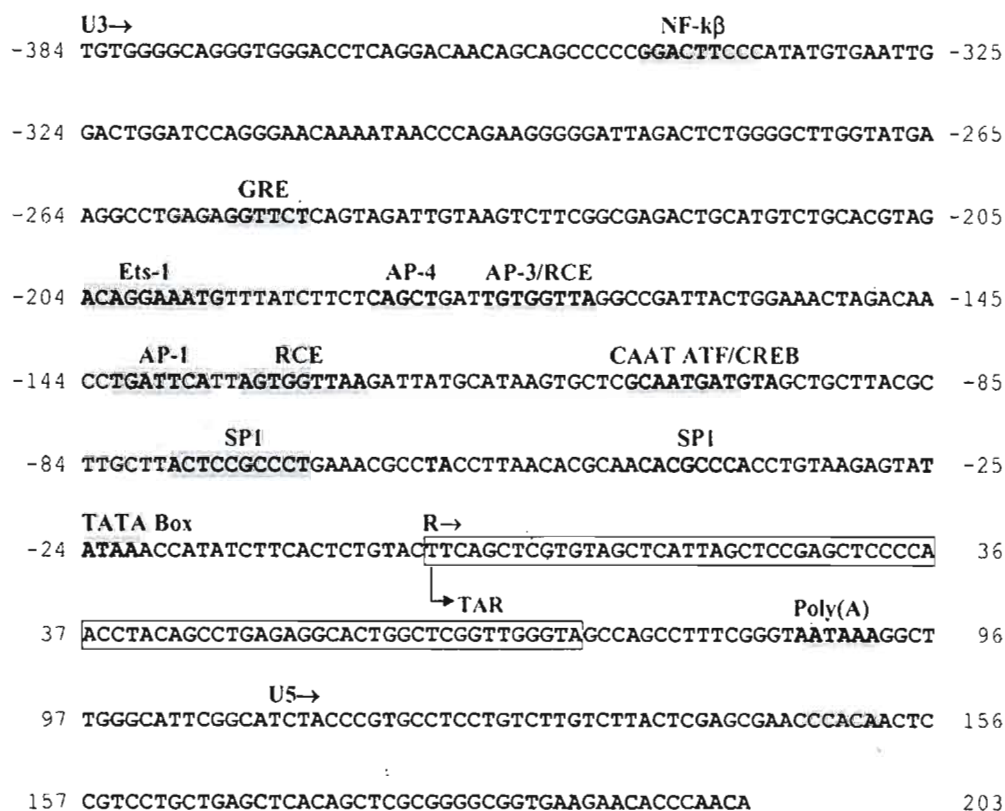


Fig. (2). Nucleotide sequence of BIV LTR. Numbers indicate nucleotide positions relative to the transcription start site. The start of U3, R, and U5 regions are indicated by an arrow. Potential regulatory elements are outlined in grey. The sequence of the transactivation responsive element (TAR) is boxed. NF-kβ: nuclear factor kβ; Ets-1: avian erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 1; AP-1, AP-3 and AP-4: activator protein-1, -3 and -4; RCE: retroviral core enhancer; CAAT: CCAAT/enhancer binding protein; ATF/CREB: activating transcription factor/cyclic

AMP responsive element binding; SP1: Stimulating Protein 1; Poly(A): polyadenylation signal.

BIV gene expression is characterized during the replication life cycle of the virus by viral mRNAs of 8.5, 4.1, 3.8, 1.7 and 1.4 kb in length (Oberste, Greenwood et Gonda, 1991). In early steps, nonstructural regulatory *tat* and *rev* genes are translated from small multiply spliced viral transcripts of 1.7 and 1.4 kb, respectively. Thereafter, the transactivator Tat protein migrates to the nucleus to enhance expression of all BIV genes, whereas the Rev protein is involved in the transport from the nucleus to the cytoplasm of the late singly spliced or unspliced viral RNAs. The capsid protein (derived from the Gag precursor) and the Gag-Pol enzyme precursor (see below) are translated from the full-length transcript of 8.5 kb. Translation of the singly spliced transcript of 3.8 kb results in the production of the envelope (Env) proteins, whereas the singly spliced transcript of 4.1 kb would produce a putative protein, termed viral infectivity factor (Vif) (St-Louis, Cojocariu et Archambault, 2004). The Env protein, as for the Gag and Gag-Pol precursors, migrates to the cell plasma membrane where the genomic RNA is packaged during the budding of morphologically immature virions through the plasma membrane of infected cells (Bukrinskaya, 2004). The cone-shaped morphology, typical of mature lentiviruses, arises after Gag and Gag-Pol precursor cleavage by the viral protease after the budding of the virions from the infected cells (Forshey et al., 2002).

THE BIV STRUCTURAL PROTEINS

The major structural genes of BIV (*gag*, *pol* and *env*) encode polypeptide precursors to generate structural (Gag and Env) and viral enzyme (reverse transcriptase, integrase and protease) proteins. The *gag* (for group antigen-associated gene) gene, located 3' from the 5' LTR, encodes the Gag precursor protein (Gag Pr53) involved in virus particle assembly. Gag Pr53 is cleaved, during virus maturation, by the viral protease leading to the production of matrix (MA) p16,

capsid (CA) p26, nucleocapsid (NC) p13, and three small proteins p21, p3 and p2 the role of which in the replication cycle of BIV has yet to be determined (Rasmussen et al., 1990; Battles et al., 1992; Tobin et al., 1994). Following virus maturation, MA protein remains associated with the inner layer of the viral envelope, whereas CA forms a conical shell surrounding the NC-RNA complex (Tobin et al., 1994). Finally, Pr53 Gag precursor contains a spacer sequence between CA and NC essential for assembly of the BIV (Guo et al., 2004).

The *pol* gene partially overlaps the Gag-encoding sequence. Its expression as a pr170 precursor is associated with a -1 frameshift event which occurs near the 3' terminus of the *gag* gene (Battles et al., 1992). Pr170 is processed by cellular proteases into the viral protease (PR), reverse transcriptase (RT) and integrase (IN) (Battles et al., 1992). As mentioned above, PR exerts its enzymatic activity on Gag Pr53 whereas RT is responsible for the synthesis of proviral DNA from the genomic RNA of BIV (Avidan, Bochner et Hizi, 2006). BIV RT appears to be less accurate than the RT of HIV-1 during the proviral DNA synthesis step (Avidan, Bochner et Hizi, 2006). Moreover, the same group of investigators also described two recombinant isoforms of BIV RT with amino acid differences at the C-termini of the proteins: a short form of RT (RT-1) composed of 546 amino acids and a long form of RT (RT-2) with 620 amino acids (Avidan, Bochner et Hizi, 2006). The longer BIV RT version is functionally less active than the shorter version, suggesting that the extra 74 residues at the C-terminus may obstruct efficient catalysis (Avidan, Bochner et Hizi, 2006). In addition, this stretch of 74 residues in BIV RT-2 has a homology with dUTPases of other lentiviruses such as FIV and EIAV (Elder et al., 1992; Threadgill et al., 1993). These FIV and EIAV proteins are encoded by a gene located between the RT- and IN-encoding segments of the *pol* gene; interestingly, the BIV-related 74 residue-encoding sequence also is located between the *pol* gene RT- and IN-encoding segments (Avidan, Bochner et Hizi, 2006). Although the biological function of the 74 residues in BIV RT-2 is unknown, it is noteworthy that the

dUTPase of EIAV has been associated with viral virulence and high mutation rate and was required to facilitate productive viral replication in non-dividing cells (Payne et Elder, 2001). Finally, several IN isoforms were described in BIV, and were shown, like HIV-1, to exert substantial and comparable strand transfer catalytic and 3'-end processing activities (Avidan et Hizi, 2008). Furthermore, the transcriptional co-activator LEDGF/p75, the main cellular interacting protein of HIV-1 IN, also interacts with BIV IN and is required for efficient viral replication (Cherepanov, 2007; Engelman et Cherepanov, 2008).

The *env* gene encodes the Pr145 precursor protein (145 kDa). Pr145 is cleaved by cellular proteases into two proteins of the viral envelope, SU (surface) and TM (transmembrane) SU which are linked by a disulfide bridge in the virion (Rasmussen, Greenwood et Gonda, 1992). The SU protein binds to cellular host receptors and thereby determines the cellular tropism of the virus. The TM protein allows the anchor of Env complex in the lipid bilayer and facilitates the fusion between viral and cellular membrane. The TM protein is responsible for the formation of syncytia in BIV infected cells (Gonda et al., 1994).

The induced antibody immune response is a characteristic of BIV infection. As reported with HIV p24 capsid protein in the course HIV infection in the human (Gaines et al., 1987), immune response associated with the BIV major capsid protein p26 was shown to induce the earliest and strongest BIV-specific immune response in animals experimentally infected with BIV (Whetstone, VanDerMaaten et Black, 1990). However, the immune reactivity to p26 was observed decreasing over time and, as a result, reaching undetectable levels by 1.5-2.5 years after experimental infection of animals by BIV. In contrast, antibodies to the *env*-encoded TM protein appeared later than p26 protein and persisted for more than 3.5 or 4 years in animals exposed to BIV (Isaacson et al., 1995; Abed et al., 1999; Abed et Archambault, 2000).

THE BIV TAT PROTEIN AND TAR ELEMENT

Lentiviruses use viral regulatory proteins to modulate their replication. The viral Tat protein up-regulates the levels of viral gene expression. The Tat proteins of BIV, JDV, and HIV-1 transactivate their respective LTRs. They interact with the cellular positive transcription elongation factor b (pTEFb) and the trans-activation responsive (TAR) element present at the 5' end of all nascent viral RNA transcripts (Gunnery, Green et Mathews, 1992; Chen et al., 1999; Barboric et al., 2000). The Tat protein is also involved in cell dysregulation which includes modulation of cell gene expression, and induces apoptosis *in vitro* (McCloskey et al., 1997; Xuan et al., 2008).

Tat is a phosphoprotein located mainly in the nucleus and nucleolus of infected cells (Garvey et al., 1990; Fong et al., 1997). BIV Tat protein (14 kDa) is encoded by a multiply-spliced mRNA composed of one untranslated leader sequence (exon 1), and two encoding exons (exons 2 and 3) (Liu, Sheridan et Wood, 1992; Pallansch, Lackman-Smith et Gonda, 1992; Fong et al., 1995; Fong et al., 1997). Exon 2 only encodes a Tat protein of 103 amino acids (Tat103) which is sufficient for activating the BIV LTR (Fong et al., 1997). However, alternate splicing may result in more than one form of *tat* mRNA. In BIV, Tat proteins of 108 (Tat108) and 236 (Tat236) amino acids were described (Fong et al., 1997; St-Louis, Abed et Archambault, 2005). Tat108 and Tat236 are composed of the first 98 amino acids of exon 2 and 10 amino acids from exon 3 (Tat108) and 138 amino acids encoded from the *rev* sequence (Tat236), respectively.

BIV Tat contains five structural domains such as acidic amino terminal, cysteine-rich, highly conserved core, basic and carboxy terminal domains (Ruben et al., 1989; Liu, Sheridan et Wood, 1992; Carpenter et al., 1993; Fong et al., 1997). The functional domain of BIV Tat is made of an activation domain and an RNA-binding domain. The activation domain includes the N-terminal, cysteine-rich and central core domains which are essential for the interaction of Tat with the pTEFb cell

protein (Bieniasz et al., 1998; Bogerd et al., 2000). The RNA-binding domain of Tat contains a basic sequence rich in arginine residues which includes the nuclear localization signal (NLS) (Bieniasz et al., 1998; Efthymiadis, Briggs et Jans, 1998). The arginine-rich motif (ARM) is also responsible for the internalization of extracellular Tat protein by neighboring cells (Tyagi et al., 2001; Deng et al., 2006; Deng et al., 2008). This internalization event may induce several biological effects on uninfected target cells by activation or repression of cellular transcription factors and cytokines (Purvis et al., 1992; Ensoli et al., 1993; Macian et Rao, 1999). These effects contribute to the progression of viral infection (Buonaguro et al., 1992; Mischiati et al., 1999; Marchio et al., 2005).

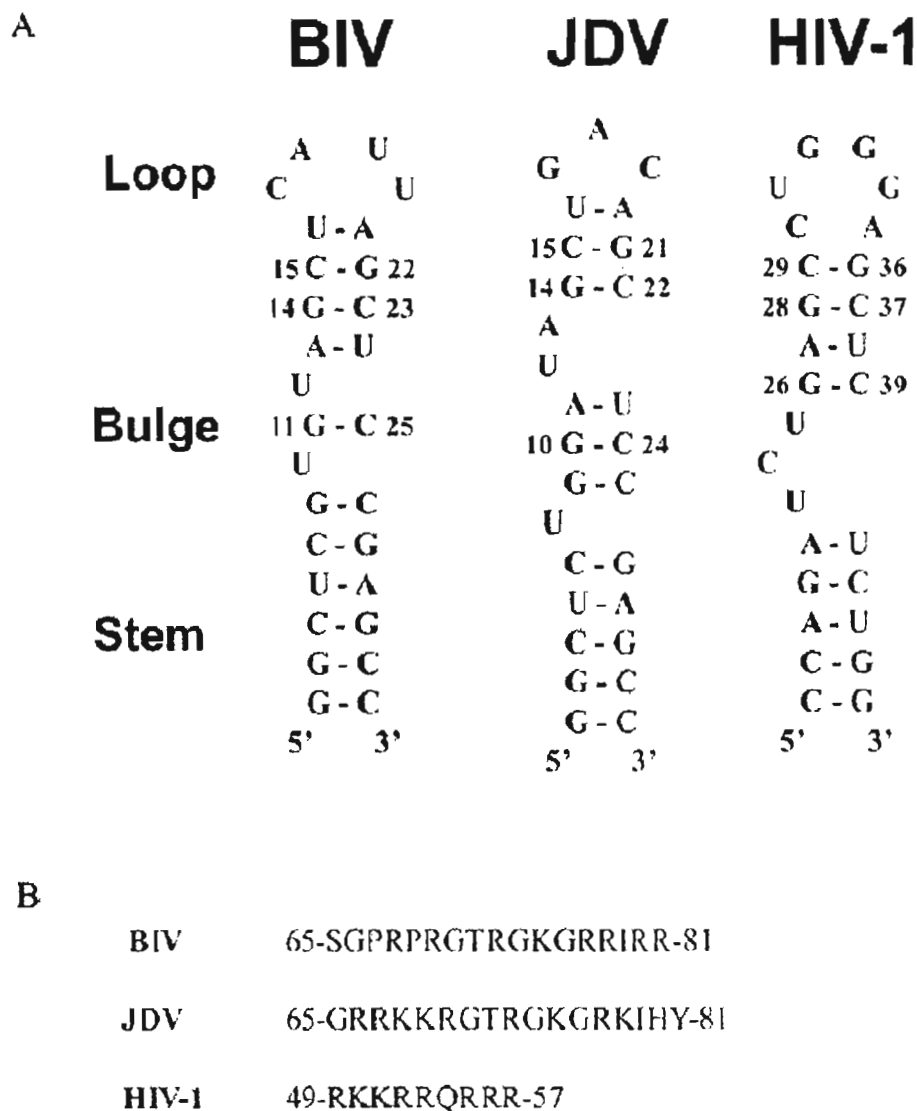


Fig. (3). Comparison of BIV, JDV and HIV-1 TAR RNAs (A) and Tat arginine-rich motifs (ARM) (B). Adapted from Lustig *et al.* (1998) and Chen *et al.* (1999b).

Lentivirus gene expression associated with Tat is dependent of the phosphorylation of cell factors. Initiation of transcription starts in the 5' LTR by the recruitment of RNA polymerase II (RNA polII) along with the transcription factor II H (TFIIH) (Garcia-Martinez *et al.*, 1997). TFIIH phosphorylates the residues present in the carboxy-terminal domain (CTD) of RNA polII (Okamoto *et al.*, 1996; Garber *et*

al., 2000). This phosphorylation step initiates transcription at the junction of U3 and R (Ping et Rana, 1999), resulting in the synthesis of the TAR RNA element (Feng et Holland, 1988). Tat activity requires the recruitment of pTEFb to the newly synthesized TAR element (Mancebo et al., 1997; Zhang et al., 2000). The pTEFb factor is composed of two major subunits, the cyclin-dependent kinase 9 (CDK9) and the cyclin T1 (cycT1). The cycT1 protein binds directly to the cysteine-rich domain of Tat while CDK9 through its kinase activity hyperphosphorylates the carboxy terminal domain (CTD) of RNA polII (Fujinaga et al., 1998; Barboric et al., 2000; Bogerd et al., 2000). This hyperphosphorylation process enhances the stability and the efficiency of the transcription complex resulting in the formation of complete viral transcripts (Herrmann et Rice, 1995; Ping et Rana, 1999).

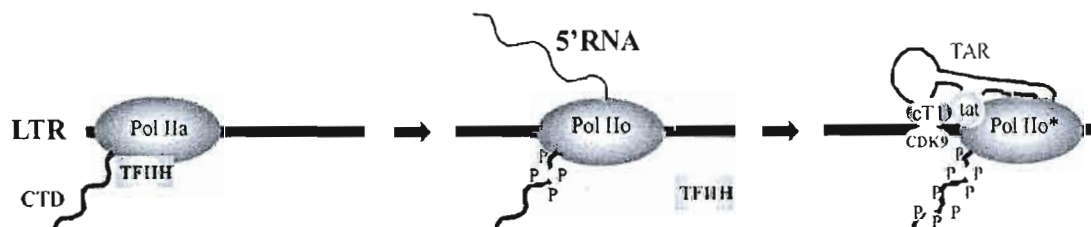


Fig. (4). Model of TAR-dependent Tat transactivation in lentiviruses. The pre-initiation complex formed by RNA polIIa and TFIIH binds to the LTR. Viral transcription is initiated when TFIIH phosphorylates the carboxyterminal domain (CTD) of RNA polIIa to generate RNA polIIo. In presence of Tat, the cyclin T1 (cT1) and CDK9 are recruited by Tat to the TAR RNA element. Once bound to TAR RNA, CDK9 phosphorylates the CTD of RNA polIIo to generate the hyperphosphorylated form of RNA polIIo*. This leads to highly processive elongation, resulting in increased production of full-length transcripts. P circles indicate phosphorylation events.

The length and structure of the TAR element vary among lentiviruses. For instance, the TAR RNA of BIV, JDV and HIV-1 forms a stem-bulge-loop hairpin structure composed of 28, 27 and 59 nt, respectively (Fig. 3) (Colvin et Garcia-Blanco, 1992; Chen et Frankel, 1994; Lustig, Bahar et Jernigan, 1998; Chen et al., 1999). BIV Tat interacts with the stem of TAR and directly binds the bulge to form a triple bases RNA structure consolidated by hydrogen bonds (Moore, Keil et Coats,

1996; Lim et Barton, 1997). In contrast to HIV-1, the central loop in BIV TAR is not essential for the binding of BIV Tat (Chen et Frankel, 1994; Puglisi et al., 1995; Barboric et al., 2000).

The Tat protein of lentiviruses may exert heterologous activity. BIV Tat acts weakly on the HIV-1 and JDV LTR whereas JDV Tat strongly transactivates the BIV and HIV-1 LTRs (Chen et al., 1999; Calabro, Daugherty et Frankel, 2005). It is noteworthy that JDV Tat protein acts as a chameleon in adopting various conformations and using different amino acids to transactivate the BIV and HIV-1 LTR (Smith, Calabro et Frankel, 2000). However, HIV-1 Tat does not transactivate either BIV or JDV LTR (Barboric et al., 2000; Bogerd et al., 2000; Calabro, Daugherty et Frankel, 2005). The ability of Tat to interact with the cycT1 determines the host-range of Tat function. Several studies indicate that a cysteine residue at position 261 of cycT1 is critical for HIV-1 Tat-pTEFb-TAR complex formation, but this is not observed in bovine lentiviruses (Chen et Frankel, 1994; Bieniasz et al., 1998; Kwak et al., 1999; Garber et al., 2000). Moreover, a pre-formed complex Tat-pTEFb binds to TAR in HIV-1 while BIV Tat may recognize the TAR element with high affinity in presence or absence of cycT1 (Chen et Frankel, 1994; Puglisi et al., 1995; Ye, Kumar et Patel, 1995; Barboric et al., 2000; Bogerd et al., 2000). As opposed to HIV-1, BIV Tat-TAR interaction is efficient in several mammalian cells indicating a flexibility for BIV Tat to recruit cycT1 (Barboric et al., 2000; Bogerd et al., 2000; Das et al., 2004). Finally, previous studies indicate an acetylated lysine residue in the activation domain of HIV-1 Tat (Kiernan et al., 1999; D'Orso et Frankel, 2009). In contrast to bovine lentiviral Tat proteins, this acetylated lysine residue is essential for efficient HIV-1 transcription as it enhances the affinity and stability of the Tat-pTEFb-TAR complex (Kiernan et al., 1999; D'Orso et Frankel, 2009).

THE BIV REV PROTEIN

In addition to the *tat* gene, the *rev* gene is another important gene that is important for virus gene expression during the replication cycle of BIV. As reported in HIV-1, Rev mediates the nuclear exportation of partially spliced viral RNAs encoding structural proteins, and of unspliced RNAs that serve as genomic RNA by interacting with a stem-loop structure dubbed Rev responsive element (RRE) present in these RNAs (Pollard et al., 1998; Cullen, 2003). To exert its function, Rev shuttles between the nucleus and the cytoplasm of the infected cells via the importin/exportin proteins or nucleoporin pathway (Pollard et al., 1998; Cullen, 2003).

The BIV Rev protein is produced from a multiply-spliced mRNA which comprises the untranslated leader sequence (exon 1) and two encoding exons (exons 2 and 3) located in each side of the *env* gene of the proviral genome (Oberste et al., 1993). BIV Rev is a 23 kDa (186 amino acids in length) phosphoprotein that localizes into the nucleus and nucleoli of infected cells (Oberste et al., 1993). BIV Rev is predicted to be functionally analogous to HIV-1 Rev (Oberste et al., 1993). As reported in HIV-1, the lentivirus Rev proteins contain at least three central functional domains essential for their activity: a basic arginine-rich domain that mediates RNA binding and contains the nuclear and nucleolar localization signals (NLS/NoLS), a multimerization domain and a leucine-rich domain essential for the nuclear exportation (NES) of Rev (Pollard et al., 1998; Narayan et al., 2003). During the replication cycle of the virus, the Rev protein produced in the cytoplasm enters into the nucleus via its interaction with cellular importins. Rev multimerizes in the nucleus and binds to the viral RNAs which are exported to the cytoplasm via the CRM-1 exportation pathway and then translated in viral proteins (Fig. 5) (Cullen, 2003).

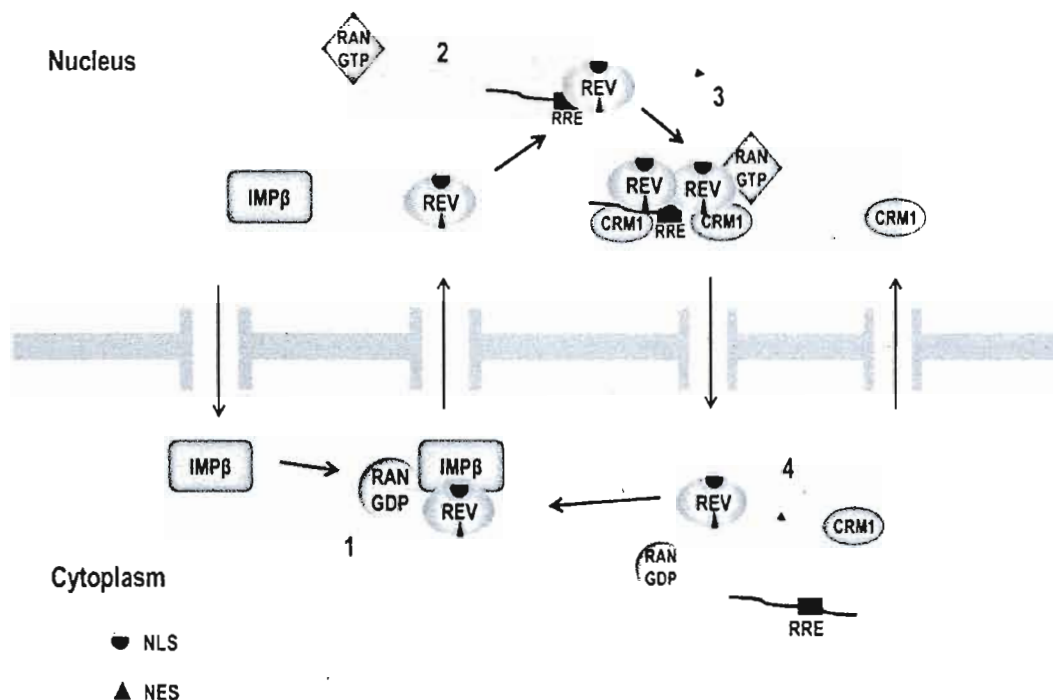


Fig. (5). Model of Rev nucleocytoplasmic transport in lentiviruses *via* the nucleoporin pathway. (1) Rev is imported in the nucleus *via* the interaction with importins, mainly importin β , which recognize the nuclear localization signal (NLS) in Rev; interaction of the Rev-importin β complex with Ran-GDP facilitates translocation through the nuclear pore. (2) The Rev-importin β -Ran-GDP complex dissociates in the nucleus, Ran-GDP is converted to Ran-GTP and importin β is exported into the cytoplasm; Rev then binds the RRE present in partially and unspliced viral RNAs. (3). CRM1 binds the nuclear exportation signal (NES) in Rev and this interaction is facilitated by the GTP-bound form of the Ran GTPase; the Rev/RRE/CRM1/Ran-GTP complex is then exported into the cytoplasm. (4) The dissociation of the Rev/RRE/CRM1/Ran-GTP complex is induced in the cytoplasm by hydrolysis of Ran-GTP to Ran-GDP; CRM1 is then imported into the nucleus, and Rev can start a new nucleocytoplasmic cycle.

Importation of HIV-1 Rev from the cytoplasm into the nucleus is mediated by the direct binding of NLS to the nuclear transport receptors, mainly importin β but also transportin, importin 5 and importin 7 (Arnold et al., 2006). Rev and “*Rev-like*” proteins such as those of HIV-1, EIAV and Human T cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) have a classical monopartite NLS (Pollard et Malim, 1998; Younis et

Green, 2005; Lee et al., 2006). In contrast, BIV Rev contains a bipartite NLS which was mapped to the arginine-rich domain in the central region of the protein (Gomez Corredor and Archambault, submitted). Finally, the RNA binding site (RBD) within the arginine-rich domain which specifically binds the RRE were mapped in HIV-1 (Bohnelein, Berger et Hauber, 1991) and EIAV ((Lee et al., 2006). The amino acids that composed the RBD of BIV Rev have yet to be determined.

The second important domain in the lentivirus Rev proteins is the multimerization domain (Zapp et al., 1991; Edgcomb et al., 2008). The regions located at each end of the arginine-rich motif of the protein were shown to be essential for the multimerization of HIV-1 Rev (Pollard et Malim, 1998). Moreover, BIV Rev multimerizes *in vitro* and two regions of the protein were identified for this process (Gomez Corredor and Archambault, unpublished data). It is under investigation in our laboratory whether BIV Rev multimerization occurs *in vivo* e.g. in cells expressing the protein.

The NES within the leucine-rich domain of the lentiviral Rev proteins is the last essential element to ensure the function of these proteins. The NES of Rev is recognized by the CRM1 or exportin 1 that allows, together with Ran-GTP, the exportation of the protein from the nucleus into the cytoplasm of the cell (Cullen, 2003). The NES of HIV-1 and of other Rev-like proteins corresponds to $\phi(X_{2-3})\phi(X_{2-3})\phi(X)\phi$ consensus sequence (where ϕ can be a leucine, valine, methionine, isoleucine or phenylalanine, X refers to any amino acid residues, and the numbers in parentheses denote the number of repeats) (Tiley et Cullen, 1992; Pollard et Malim, 1998; Dong et al., 2009). In BIV, preliminary data conducted in our laboratory indicate that Rev is exported via CRM1 as for HIV-1 (Gomez Corredor and Archambault, unpublished).

GENETIC DIVERSITY IN BIV

Genetically variant retroviruses (associated to the so-called quasispecies) are a result of reverse transcriptase-induced errors, recombinational events, mutations, and selective forces that act on the viral population (Boyer, Ferris et Hughes, 1992; Truyen et al., 1995; Burke, 1997; Mansky, 1998). Genetic variability is mostly confined to regions of the genome encoding the SU envelope proteins due to immune pressures (Chirmule et Pahwa, 1996). However, genetic variation in other regions of the genome may occur, including those encoding the regulatory/accessory proteins or nucleic acid sequences involved in viral gene expression or biogenesis.

Genetic variation within the *pol* and *env* sequences was reported in BIV (Suarez et Whetstone, 1995; Suarez et Whetstone, 1997; Cooper et al., 1999; Meas et al., 2001). Sequence analysis of two developed molecular infectious cDNA clones (BIV 106 and BIV 127) shows an overall genomic variability of 1.7% with 75% of the substitutions occurring in the SU-coding region of the *env* gene (Garvey et al., 1990). DNA sequence analysis of American BIV field isolates, different from R-29, indicated substantial genetic variations among different strains (up to 10% divergence in the conserved *pol* gene) (Suarez et al., 1993; Suarez et Whetstone, 1995). Genetic variation was also shown by in-depth analysis of these isolates as well as size variation by an apparent recombinational event within the second hypervariable region of SU-coding gene in naturally and experimentally BIV-infected cattle (Suarez et Whetstone, 1995; Suarez et Whetstone, 1997). Other observations indicate that genomic comparisons of a portion (183 bp) of the *pol* gene from various BIV isolates show non-conservative amino acid changes (Cooper et al., 1999). Thus, the overall results of these genomic comparisons, indicating diversity in both product size and sequence, suggest a quasispecies phenomenon for BIV.

As observed in lentivirus structural proteins, variation may occur in regulatory/accessory genes or sequences involved in virus gene expression. Indeed,

genetic variation was reported in HIV LTR as well as in HIV *tat* and *rev* genes in individuals infected with the virus. The resulting mutated sequences were shown to have an impact on the regulation of virus gene expression and may suggest a role in virus virulence (Golub, Li et Volsky, 1990; Martins et al., 1991; Nagashunmugam et al., 1992; Hua, Caffrey et Cullen, 1996; Krebs et al., 1998; Zhang et Dayton, 1998; Peloponese et al., 1999; Hiebenthal-Millow et al., 2003). Moreover, variation in HIV Rev affects the RNA nuclear export and, consequently, the levels of structural protein production (Belshan et al., 1998). Finally Belshan *et al.* (Belshan et al., 2001) described a correlation of a Rev variation and the stage of disease over time in EIAV infected-ponies.

More recently, we reported the identification and characterization of a new form of BIV Tat protein termed Tat236 (St-Louis, Abed et Archambault, 2005). It was derived from a *tat/rev* cDNA obtained by reverse transcription-PCR from RNA extracted from cells infected with a presumably BIV variant isolated from the spleen of rabbits three years after infection with the virus. This Tat236 contains the first 98 amino acids of Tat103 and the 3' end 138 amino acids of Rev as mentioned above. Reporter gene assays indicated that transactivation of BIV LTR by Tat236 is higher than the original BIV Tat103 or Tat108 proteins in several cell lines. Moreover, it was showed that the enhanced activity of Tat236 could be attributed to the arginine-rich region of the Rev portion of the protein. This contrasts with the HIV-1 hybrid Tat, Env and Rev proteins, termed Tnv and Tev, which displayed transactivation activity that was lower than that of the original HIV-1 Tat, even though they have the functional domains of Tat and Rev (Benko et al., 1990; Salfeld et al., 1990). Therefore, the Tat236 is the first hybrid Tat protein from BIV or any other lentivirus that shows higher transactivation than the original transactivator Tat proteins. Identification of Tat236 may also suggest that BIV could undergo temporal genetic evolution *in vivo* with possibly altered biological properties. In addition, we also identified a new BIV LTR sequence (LTRn) obtained by PCR from the DNA of cells

infected with the BIV variant mentioned above (Cojocariu, St-Louis et Archambault, 2009). Sequence analysis indicated that the LTRn U3 region harbors three nucleic acid mutations at residue positions -194, -135 and -114 as opposed to the original (wild-type) LTR sequence. Reporter gene assays indicated that LTRn promotes basal and Tat-mediated transactivation activity to levels significantly higher than those obtained from the wild-type LTR. Restoration experiments to the wild-type genotype indicated that both the -135 and -114 nucleic acid substitutions were responsible for the enhanced promoter activity of BIV LTRn. Although the Tat236 and LTRn results could represent an adaptation of BIV to a heterologous host species (e.g. the rabbit), they clearly indicate genetic variation in the course of BIV infection and an impact on their respective activity *in vitro*. Whether these genetic variations could have an impact in virus virulence or pathogenesis within an infected natural host (such as cattle) has yet to be determined.

CONCLUDING REMARKS

Substantial progress was made on BIV in the last 20 years by establishing the fact that it was indeed a lentivirus. Then, novel forms of BIV Tat protein, termed Tat236, and of LTR sequence were found in BIV-infected cells (St-Louis, Abed et Archambault, 2005; Cojocariu, St-Louis et Archambault, 2009). The significance of Tat236 and of the LTR sequence variant in BIV life replication cycle or a possible impact in BIV biogenesis, are, at present, unclear. Other exciting fields of BIV research also were the development of BIV-based lentiviral vectors to deliver a gene of interest for human gene therapy (Matukonis et al., 2002; Molina et al., 2002; Molina et al., 2004). Moreover, lentivirus peptide inhibitors blocking BIV Tat-TAR interaction were developed and one may anticipate that these types of inhibitors would be used clinically against HIV (Runyon et Puglisi, 2003; Athanassiou et al., 2004; Athanassiou et al., 2007; Mills, Shelat et Guy, 2007). Finally, even though BIV induces a life-long persistent infection in cattle, the attribution of clinical disease to BIV is still controversial, and there is no overt immunodeficiency state associated to

BIV infection. This may due partly to the fact that most studies have been conducted with the BIV R-29 isolate. Therefore, further research is required to obtain new BIV isolates to unequivocally establish the pathogenic impact of BIV infection in cattle.

ACKNOWLEDGEMENTS

DA is supported by a Discovery grant from the National Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC). AGC is supported by a graduate student fellowship from the University of Quebec at Montreal Foundation. We are deeply grateful to Dr. Alain M. P. Bouillant for revision and edition of the manuscript.

APPENDICE B: COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES

Preliminary characterization of functional domains of bovine immunodeficiency-like virus Rev protein

Andrea Gomez Corredor et Denis Archambault
Département des Sciences Biologiques,
Université du Québec à Montréal, Québec, Canada

Résumé pour le « *89th Annual Meeting of the Conference of Research Workers in Animal Disease* », Chicago, USA, December 7-9 2008 (presentation orale)

The Rev family proteins, has essential roles in replication of lentiviruses including human immunodeficiency virus (HIV-1), equine infection anemia virus (EIAV), and bovine immunodeficiency-like virus (BIV). Rev mediates nuclear export of unspliced and partially spliced viral RNA through interaction with the Rev response element (RRE). The lentiviruses Rev proteins contains at least three functional regions: a basic Arg-rich domain that mediates RNA binding (RBD) and nuclear localization (NLS), two regions needed for the oligomultimerization (in HIV-1) and a leucine-rich motif necessary for the nuclear export of Rev (NES). The only study of BIV Rev protein (Obereste et al, 1993) showed that Rev is a protein of 186 aa, phosphorylated, and localized in the nucleus and, particularly, in the nucleoli. The amino acid sequence of BIV Rev does not display any evident homology to the basic and leucine-rich motifs characteristic of other known Rev proteins. In order to map functional domains and to identify specific motifs that are essential for BIV Rev activity, deletion mutants were generated by PCR-Ligation-PCR. The different mutants were expressed in prokaryotic and eukaryotic systems. To identify the region(s) important for the intracellular localization, the different mutants were fused to enhanced green fluorescent protein (EGFP) and then tested in transient transfection assays and analyzed by confocal microscopy. For the studies of RNA binding and oligomerization, the different proteins were produced in *E. coli* and purified by affinity chromatography by His-Tag. The preliminary results show that the region between the amino acids 70-90 is necessary for nuclear localization and that at least the first Arginine of the probably basic domain (position 70) is essential for the function. We have identified two important regions for Rev oligomerization, encompassing the amino acids 1-30 and 70-90. Experiences of double mutants and rescue are currently underway to confirm these results and to identify the other domains as RBD and NES. This is the first report of an exhaustive study of the different functional domains of BIV Rev protein.

Caractérisation des domaines de multimérisation et du signal d'exportation nucléaire de la protéine Rev du virus de l'immunodéficience bovine

Andrea Gomez Corredor et Denis Archambault
Département des Sciences Biologiques,
Université du Québec à Montréal, Québec, Canada

Résumé pour le 5^{ème} Colloque annuelle Biomed 30 avril 2009 (présentation par poster)

La protéine Rev a une fonction essentielle dans la réplication des lentivirus tels que le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) et le virus de l'anémie infectieuse équine (EIAV). Le rôle de Rev est d'exporter les ARNs viraux non épissés et partiellement épissés du noyau au cytoplasme. Ces ARNs vont ensuite être traduits pour produire en outre les protéines nécessaires à l'assemblage des nouvelles particules virales. Pour transporter ces ARNs, la protéine Rev se lie à une séquence nommée Élément de réponse à Rev (RRE), retrouvée dans l'extrémité 3' des ARN viraux et fait un cycle de transport entre le noyau et le cytoplasme via le complexe des nucléoporines. Les protéines Rev des lentivirus contiennent minimalement trois domaines fonctionnels importants: un domaine basique riche en arginines nécessaire à la liaison de l'ARN (RNA binding domain ou RBD) et à la localisation nucléaire (NLS), un domaine riche en leucines nécessaire à l'exportation du complexe Rev-ARN (NES) et deux régions nécessaires à la multimérisation de Rev. La protéine Rev du VIB contient 186 acides aminés (aa); cependant, les domaines fonctionnels de la protéine Rev du VIB ne sont pas encore caractérisés. Fait intéressant, la protéine Rev du VIB ne présente pas une grande homologie de séquence avec les protéines Rev caractérisées des autres lentivirus, d'où l'intérêt d'étudier cette protéine. Pour identifier les domaines possibles associés à la multimérisation et au NES de la protéine Rev du VIB, différents mutants de délétion de Rev (par tranche de 20 aa) ont été générés et produits dans un vecteur d'expression procaryote (pET21b) et dans deux vecteurs d'expression eucaryote (pcDNA3.0 Myc/His et pEGFP-C1). Pour déterminer si la protéine Rev sauvage est capable de former des multimères, des expériences de crosslinking *in vitro* (avec la protéine purifiée) et de microscopie confocale avec la protéine Rev sauvage fusionnée avec la GFP (Rev-WT-GFP) et à la RFP (Rev-WT-RFP) ont été réalisées. Pour identifier le domaine NES de Rev, les plasmides codant pour la protéine Rev sauvage et les différents mutants ont été cotransfectés avec un plasmide (pDM138-VIB) qui contient, entre les sites donneur et accepteur d'épissage du VHI-1, le gène rapporteur Chloramphénicol Acetyl Transférase (CAT) et le site RRE du VIB. Les résultats ont démontré que la protéine Rev est capable de former des multimères. Deux régions de la protéine seraient impliquées dans cette fonction: une région localisée au niveau de l'extrémité N-

terminale de la protéine et une autre localisée entre les aa 90 et 110. D'autre part, la région associée au NES fut localisée entre les aa 110 et 130 de Rev. Des études de mutagenèse dirigée sont présentement en cours pour identifier les résidus importants pour le domaine de multimérisation et le NES. De plus, des expériences de FRET (Fluorescence Energy Transfer) dans des cellules sont également en cours pour confirmer les résultats de multimérisation *in vitro*.

Caractérisation des signaux de localisation nucléaire et nucléolaire de la protéine Rev du virus de l'immunodéficience bovine, un virus apparenté au virus du SIDA

Andrea Gomez Corredor et Denis Archambault

Département des Sciences Biologiques,

Université du Québec à Montréal, Québec, Canada

Résumé pour le 5^{ème} *Colloque annuelle Biomed* 30 avril 2009 (présentation orale)

La protéine Rev a une fonction essentielle dans la réplication des lentivirus comme le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) et le virus de l'anémie infectieuse équine (EIAV). Rev a comme rôle l'exportation des ARNs viraux non épissés et partiellement épissés du noyau au cytoplasme. Ces derniers vont en outre générer les différentes protéines nécessaires à l'assemblage des nouvelles particules virales. Pour transporter les ARNs, la protéine Rev réalise un cycle de transport entre le noyau et le cytoplasme via le complexe des nucléoporines. Pour l'étape de son entrée dans le noyau, Rev interagit avec l'importine B qui reconnaît le signal de localisation nucléaire (NLS) de Rev. La protéine Rev contient également un signal de localisation nucléolaire (NoLS). Par contre, la fonction de Rev au niveau du nucléole n'est pas très bien élucidée. Les NLSs et NoLSs des principales protéines Rev des lentivirus ont été bien caractérisés: les NLSs sont du type classique monopartite et les NoLS sont localisés dans la même région que les NLSs. La protéine Rev du virus de l'immunodéficience bovine (VIB) est composée de 186 acides aminés (aa). L'unique étude réalisée sur Rev du VIB a démontré que c'est une protéine qui se localise au noyau et au nucléole des cellules infectées. Cependant, la localisation et la composition des différents domaines fonctionnels de Rev du VIB n'ont pas encore été déterminées. Pour identifier le NLS et le NoLS de Rev du VIB, différents plasmides d'expression associés à des mutants de délétion de Rev (par tranche de 20 aa) fusionnés à la protéine GFP ont été générés, puis transfectés dans des cellules appropriées. La localisation des différentes protéines exprimées a été analysée par microscopie confocale. Les résultats préliminaires ont montré que la protéine Rev du VIB contient trois régions impliquées dans la localisation nucléaire, deux de ces régions étant essentielles alors que la troisième aurait un rôle accessoire. Par la suite, les régions impliquées ont été délimitées par la réalisation de délétions ponctuelles des acides aminés basiques de type Arginine et Lysine. Les résidus importants ont été confirmés par mutagenèse dirigée. Les résultats ont montré que le NLS de Rev du VIB est du type tripartite divisé en signal bipartite essentiel pour la localisation de la protéine au noyau et en signal monopartite non classique localisé dans l'extrémité C-terminale de la protéine. Les résidus qui composent le NoLS se trouvent dans la région bipartite du NLS. Cette étude est le premier rapport d'un NLS tripartite dans la famille de protéines Rev chez les lentivirus.

Caractérisation préliminaire des domaines de multimérisation et d'exportation de la protéine Rev du virus de l'immunodéficience bovine

Andrea Gomez Corredor et Denis Archambault
Département des Sciences Biologiques,
Université du Québec à Montréal, Québec, Canada

Résumé pour le **Congres Armand-Frappier**, Château Bromont, Estrie Novembre 5 au 7
2009 (presentation par poster)

La protéine Rev a une fonction essentielle dans la réplication des lentivirus tels que le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) et le virus de l'anémie infectieuse équine (EIAV). Le rôle de Rev est d'exporter les ARNs viraux non épissés et partiellement épissés du noyau au cytoplasme. Ces ARNs vont ensuite être traduits pour produire en outre les protéines nécessaires à l'assemblage des nouvelles particules virales. Pour transporter ces ARNs, la protéine Rev se lie à une séquence nommée Élément de réponse à Rev (RRE), retrouvée dans l'extrémité 3' des ARN viraux et fait un cycle de transport entre le noyau et le cytoplasme via le complexe des nucléoporines. Les protéines Rev des lentivirus contiennent minimalement trois domaines fonctionnels importants: un domaine basique riche en arginines nécessaire à la liaison de l'ARN (RNA binding domain ou RBD) et à la localisation nucléaire (NLS), un domaine riche en leucines nécessaire à l'exportation du complexe Rev-ARN (NES) et deux régions nécessaires à la multimérisation de Rev. La protéine Rev du VIB contient 186 acides aminés (aa); cependant, les domaines fonctionnels de la protéine Rev du VIB ne sont pas encore caractérisés. Fait intéressant, la protéine Rev du VIB ne présente pas une grande homologie de séquence avec les protéines Rev caractérisées des autres lentivirus, d'où l'intérêt d'étudier cette protéine. Pour identifier les domaines possibles associés à la multimérisation et au NES de la protéine Rev du VIB, différents mutants de délétion de Rev (par tranche de 20 aa) ont été générés et produits dans un vecteur d'expression procaryote (pET21b) et dans deux vecteurs d'expression eucaryote (pcDNA3.0 Myc/His et pEGFP-C1). Pour déterminer si la protéine Rev sauvage est capable de former des multimères, des expériences de crosslinking *in vitro* (avec la protéine purifiée) et de microscopie confocale avec la protéine Rev sauvage fusionnée avec la GFP (Rev-WT-GFP) et à la RFP (Rev-WT-RFP) ont été réalisées. Pour identifier le domaine NES de Rev, les plasmides codant pour la protéine Rev sauvage et les différents mutants ont été co-transfectés avec un plasmide (pDM138-VIB) qui contient, entre les sites donneur et accepteur d'épissage du VHI-1, le gène rapporteur Chloramphénicol Acetyl Transférase (CAT) et le site RRE du VIB. Les résultats ont démontré que la protéine Rev est capable de former des multimères. Deux régions de la protéine seraient impliquées dans cette fonction: une région localisée au niveau de l'extrémité N-terminale de la protéine et une autre localisée entre les aa 90 et 110. D'autre part, la région associée au NES fut localisée entre les aa 110 et 130 de Rev. Des études de mutagenèse dirigée sont présentement en cours pour identifier les résidus importants pour le domaine de multimérisation et le NES. De plus, des expériences de FRET (Fluorescence Energy Transfer) dans des cellules sont également en cours pour confirmer les résultats de multimérisation *in vitro*.

Caractérisation des domaines de multimérisation et du signal d'exportation nucléaire de la protéine Rev du virus de l'immunodéficience bovine

Andrea Gomez Corredor et Denis Archambault
Département des Sciences Biologiques,
Université du Québec à Montréal, Québec, Canada

Résumé pour le 6^{ème} Colloque annuelle Biomed 28-29 avril 2010 (présentation par poster)

La protéine Rev a une fonction essentielle dans la réplication des lentivirus tels que le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) et le virus de l'anémie infectieuse équine (EIAV). Le rôle de Rev est d'exporter les ARNs viraux non épissés et partiellement épissés du noyau au cytoplasme. Ces ARNs vont ensuite être traduits pour produire entre autres les protéines nécessaires à l'assemblage des nouvelles particules virales. Pour transporter ces ARNs, la protéine Rev se lie à une séquence nommée "Élément de réponse à Rev (RRE)" retrouvée dans l'extrémité 3' des ARN viraux et fait un cycle de transport entre le noyau et le cytoplasme via le complexe des nucléoporines. Pour l'importation au noyau, la protéine Rev du VIH fait un complexe avec l'importine β sans utiliser la voie classique via l'importine α . Pour être exportée hors du noyau, Rev interagit avec la protéine CRM1 ou exportine 1 via son domaine d'exportation (NES « nuclear exportation signal »). La protéine Rev du VIB contient 186 acides aminés (aa); cependant, les domaines fonctionnels de la protéine Rev du VIB ne sont pas encore caractérisés. Fait intéressant, la protéine Rev du VIB ne présente pas une grande homologie de séquence avec les protéines Rev caractérisées des autres lentivirus, d'où l'intérêt d'étudier cette protéine. Pour caractériser les voies d'importation de Rev du VIB, des essais de pull down ont été réalisés avec les importines β et α fusionnées à la GST. Pour la caractérisation du domaine d'exportation de Rev du VIB, différents mutants de délétion de Rev (par tranche de 20 aa) ont été générés dans deux vecteurs d'expression eucaryote (pcDNA3.0 Myc/His et pEGFP-C1). Ensuite, la région candidate qui contient le NES potentiel a été fusionnée à la GFP et des transfections en présence et en absence de LMB (Leptomycine B, inhibiteur de l'exportation via CRM1) ont été réalisées. Pour déterminer quels acides aminés composent le signal d'exportation, une mutagenèse dirigée a été réalisée sur les différents acides aminés ciblés. Les résultats ont démontré que la protéine Rev du VIB est principalement importée via la voie classique qui implique l'importine α . De plus, Rev du VIB est exportée hors du noyau par la protéine CRM1, et les acides aminés qui conforment le signal NES ont été identifiés comme étant LEDLVRHMSL.

Caracterisation of importation and exportation pathway of bovine immunodeficiency-like virus Rev protein

Andrea Gomez Corredor et Denis Archambault
Département des Sciences Biologiques,
Université du Québec à Montréal, Québec, Canada

Résumé pour le « **Sub-Nuclear Structures and Disease** » 27-30 juillet 2010, Wellcome Trust Genome Campus, Hinxton Cambridge, UK (presentation par poster).

The Rev family proteins, has essential roles in replication of lentiviruses including human immunodeficiency virus (HIV-1), equine infection anemia virus (EIAV). and bovine immunodeficiency-like virus (BIV). Rev mediates nuclear export of unspliced and partially spliced viral RNA through interaction with the Rev response element (RRE). The lentiviruses Rev proteins contains at least three functional regions: a basic Arg-rich domain that mediates RNA binding (RBD) and nuclear localization (NLS), two regions needed for the oligomultimerization (in HIV-1) and a leucine-rich motif necessary for the nuclear export of Rev (NES). The HIV-1 Rev protein, shuttles between the nucleus and the cytoplasm of the infected cells via the importin/exportin proteins or nucleoporin pathway. The shuttling of HIV-1 Rev into the nucleus is mediated by the direct binding of Rev nuclear localization signal (NLS) to the nuclear transport receptors, mainly importin β but also transportin, importin 5 and importin 7. This mechanism differs from the classical protein importation α/β pathway where importin α serves as an adaptor that links the protein and importin β and recognizes NLSs within the proteins. The NES signal of HIV-1 Rev is recognized by the cellular export factor CRM1, which mediates the nuclear-cytoplasmic export of Rev bound RNAs. BIV Rev is a 23 kDa (186 amino acids (aa) in length) phosphoprotein. Little is known on the exact location and aa composition of the BIV Rev functional domains. We identified BIV Rev NLS and NoLS which differs from previously described in any viral or cellular proteins. In order to caracterise the importation pathway, pull-down assays are made with BIV Rev-His recombinant protein and the importin β and/or different forms of importin α fused to GST protein. To identify the amino acid composition of NES of BIV Rev, different mutants were generated and fused to enhanced green fluorescent protein (EGFP) or Myc tag. The transfection was made in presence or absence of LMB (leptomycine B, an inhibitor of CRM1 protein). The results show that BIV Rev is imported into the nucleus by classical protein importation α/β pathway. The pull-down assays showed that BIV Rev directly interact with the importin α 3 and α 5 and not with the importin β in a different way from HIV-1 Rev. Finally, BIV is exported to the cytoplasm by the CRM1 protein and the NES signal was identified and composed by LEDLVRHMSL, this signal is similar to the consensus NES signal previously reported.

Caracterisation of NLS and NoLS of bovine immunodeficiency-like virus Rev protein

Andrea Gomez Corredor et Denis Archambault
Département des Sciences Biologiques,
Université du Québec à Montréal, Québec, Canada

Résumé pour le « **Sub-Nuclear Structures and Disease** » 27-30 juillet 2010, Wellcome Trust Genome Campus, Hinxton Cambridge, UK (presentation par poster).

The bovine immunodeficiency virus (BIV) Rev protein (186 amino acids [aa] in length) is involved in the nuclear exportation of partially spliced and unspliced viral RNAs. Previous studies have shown that BIV Rev localizes in the nucleus and nucleolus of infected cells. Here we report the characterization of the nuclear/nucleolar localization signals (NLS/NoLS) of this protein. Through transfection of a series of deletion mutants of BIV Rev fused to enhanced green fluorescent protein and fluorescence microscopy analyses, we were able to map the NLS region between aa 71 and 110 of the protein. Remarkably, by conducting alanine substitution of basic residues within the aa 71 to 110 sequence, we demonstrated that the BIV Rev NLS is bipartite, maps to aa 71 to 74 and 95 to 101, and is predominantly composed of arginine residues. This is the first report of a bipartite Rev (or “*Rev-like*”) NLS in a lentivirus/retrovirus. Moreover, this NLS is atypical, as the length of the sequence between the motifs composing the bipartite NLS, e.g., the spacer sequence, is 20 aa. Further mutagenesis experiments also identified the NoLS region of BIV Rev. It localizes mainly within the NLS spacer sequence. In addition, the BIV Rev NoLS sequence differs from the consensus sequence reported for other viral and cellular nucleolar proteins. In summary, we conclude that the nucleolar and nuclear localizations of BIV Rev are mediated via novel NLS and NoLS motifs.

**La protéine Rev du virus de l'immunodéficience bovine (VIB):
identification d'une nouvelle voie d'importation et d'un nouveau
type de signal d'exportation nucléaire chez les protéines Rev des
lentivirus**

Andrea Gomez Corredor et Denis Archambault
Département des Sciences Biologiques,
Université du Québec à Montréal, Québec, Canada

Résumé pour le 7^{ème} Colloque annuelle Biomed 27-28 avril 2011 (présentation orale)

La protéine Rev a une fonction essentielle dans la réplication des lentivirus tels que le virus de l'immunodéficience humaine (VIH). Le rôle de Rev est d'exporter les ARNs viraux non épissés et partiellement épissés du noyau au cytoplasme. Ces ARNs vont ensuite être traduits pour produire en outre les protéines nécessaires à l'assemblage des nouvelles particules virales. Pour transporter ces ARNs, la protéine Rev se lie à une séquence nommée "Élément de réponse à Rev" (RRE) retrouvée dans l'extrémité 3' des ARN viraux et fait un cycle de transport entre le noyau et le cytoplasme via le complexe des nucléoporines. Pour l'importation au noyau, la protéine Rev du VIH forme un complexe uniquement avec l'importine β sans utiliser la voie classique d'importation (importines $\alpha:\beta$). Pour être exportée hors du noyau, Rev du VIH interagit avec la protéine CRM 1 ou exportine 1 via son domaine d'exportation nucléaire (NES pour "nuclear exportation signal"). La protéine Rev du VIB est composée de 186 acides aminés (aa). Cependant, les domaines fonctionnels de la protéine Rev du VIB ne sont pas bien caractérisés. Pour caractériser la voie d'importation de Rev du VIB, des essais d'importation *in vitro* dans des cellules Hela et des essais "pull-down" ont été réalisés avec les importines β et $\alpha 2$, $\alpha 3$ et $\alpha 5$ fusionnées à la GST. Pour la caractérisation du domaine d'exportation de Rev du VIB, différents mutants de délétion de la protéine (par tranche de 20 aa) ont été générés dans deux vecteurs d'expression eucaryotique (pcDNA3.0 Myc/His et pEGFP-C1). Ensuite, la région candidate contenant possiblement le NES a été fusionnée à la GFP et des transfections de cellules en présence et en absence de la leptomycine B (LMB), un inhibiteur de l'exportation via CRM 1, ont été réalisées. Pour déterminer les aa qui composent le signal d'exportation, des mutagenèses dirigées ont été réalisées ciblant des aa sélectionnés. Les résultats ont démontré que Rev du VIB est principalement importée via la voie classique d'importation qui implique les importine α et β , une première chez les lentivirus, alors qu'elle est exportée hors du noyau par la protéine CRM 1. Les aa qui composent le NES ont été identifiés comme étant LEDLVRHMSL. Ce type de NES est rencontré pour la première fois chez les protéines Rev des lentivirus.

RÉFÉRENCES

- Abed, Y. et D. Archambault (2000). "A viral transmembrane recombinant protein-based enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of bovine immunodeficiency virus infection." J Virol Methods **85**(1-2): 109-116.
- Abed, Y., G. St-Laurent, H. Zhang, R. M. Jacobs et D. Archambault (1999). "Development of a Western blot assay for detection of bovine immunodeficiency-like virus using capsid and transmembrane envelope proteins expressed from recombinant baculovirus." Clin Diagn Lab Immunol **6**(2): 168-172.
- Adam, S. A., R. S. Marr et L. Gerace (1990). "Nuclear protein import in permeabilized mammalian cells requires soluble cytoplasmic factors." J Cell Biol **111**(3): 807-816.
- Ahmad, Y., F. M. Boisvert, P. Gregor, A. Cobley et A. I. Lamond (2009). "NOPdb: Nucleolar Proteome Database--2008 update." Nucleic Acids Res **37**(Database issue): D181-184.
- Ali, S. A. et A. Steinkasserer (1995). "PCR-ligation-PCR mutagenesis: a protocol for creating gene fusions and mutations." Biotechniques **18**(5): 746-750.
- Alkhatib, G., C. Combadiere, C. C. Broder, Y. Feng, P. E. Kennedy, P. M. Murphy et E. A. Berger (1996). "CCR5: a RANTES, MIP-1alpha, MIP-1beta receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1." Science **272**(5270): 1955-1958.
- Archambault, D., S. Nadin-Davis, C. Lutze-Wallace et A. M. Bouillant (1993). "[The bovine immunodeficiency virus: 1990-1992 update]." Vet Res **24**(2): 179-187.
- Arnold, M., A. Nath, J. Hauber et R. H. Kehlenbach (2006). "Multiple importins function as nuclear transport receptors for the Rev protein of human immunodeficiency virus type 1." J Biol Chem **281**(30): 20883-20890.
- Athanassiou, Z., R. L. Dias, K. Moehle, N. Dobson, G. Varani et J. A. Robinson (2004). "Structural mimicry of retroviral tat proteins by constrained beta-hairpin peptidomimetics: ligands with high affinity and selectivity for viral TAR RNA regulatory elements." J Am Chem Soc **126**(22): 6906-6913.
- Athanassiou, Z., K. Patora, R. L. Dias, K. Moehle, J. A. Robinson et G. Varani (2007). "Structure-guided peptidomimetic design leads to nanomolar beta-hairpin inhibitors of the Tat-TAR interaction of bovine immunodeficiency virus." Biochemistry **46**(3): 741-751.
- Atkinson, B., Z. Q. Liu et C. Wood (1992). "Use of bacterial trpE fusion vectors to express and characterize the bovine immunodeficiency-like virus core protein." J Virol Methods **36**(1): 35-49.

- Avidan, O., R. Bochner et A. Hizi (2006). "The catalytic properties of the recombinant reverse transcriptase of bovine immunodeficiency virus." *Virology* **351**(1): 42-57.
- Avidan, O. et A. Hizi (2008). "Expression and characterization of the integrase of bovine immunodeficiency virus." *Virology* **371**(2): 309-321.
- Barboric, M., R. Taube, N. Nekrep, K. Fujinaga et B. M. Peterlin (2000). "Binding of Tat to TAR and recruitment of positive transcription elongation factor b occur independently in bovine immunodeficiency virus." *J Virol* **74**(13): 6039-6044.
- Baron, T., D. Betemps, F. Mallet, V. Cheynet, D. Levy et P. Belli (1998). "Detection of bovine immunodeficiency-like virus infection in experimentally infected calves." *Arch Virol* **143**(1): 181-189.
- Baron, T., F. Mallet, B. Polack, D. Betemps et P. Belli (1995). "The bovine immunodeficiency-like virus (BIV) is transcriptionally active in experimentally infected calves." *Arch Virol* **140**(8): 1461-1467.
- Barre-Sinoussi, F., J. C. Chermann, F. Rey, M. T. Nugeyre, S. Chamaret, J. Gruest, C. Dauguet, C. Axler-Blin, F. Vezinet-Brun, C. Rouzioux, W. Rozenbaum et L. Montagnier (1983). "Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS)." *Science* **220**(4599): 868-871.
- Battiste, J. L., H. Mao, N. S. Rao, R. Tan, D. R. Muhandiram, L. E. Kay, A. D. Frankel et J. R. Williamson (1996). "Alpha helix-RNA major groove recognition in an HIV-1 rev peptide-RRE RNA complex." *Science* **273**(5281): 1547-1551.
- Battles, J. K., M. Y. Hu, L. Rasmussen, G. J. Tobin et M. A. Gonda (1992). "Immunological characterization of the gag gene products of bovine immunodeficiency virus." *J Virol* **66**(12): 6868-6877.
- Bäumert, H. G. et H. Fasold (1989). "Cross-linking techniques." *Methods Enzymol* **172**: 584-609.
- Bayer, T. S., L. N. Booth, S. M. Knudsen et A. D. Ellington (2005). "Arginine-rich motifs present multiple interfaces for specific binding by RNA." *Rna* **11**(12): 1848-1857.
- Belloc, C., B. Polack, I. Schwartz-Cornil, J. Brownlie et D. Levy (1996). "Bovine immunodeficiency virus: facts and questions." *Vet Res* **27**(4-5): 395-402.
- Belshan, M., P. Baccam, J. L. Oaks, B. A. Sponseller, S. C. Murphy, J. Cornette et S. Carpenter (2001). "Genetic and biological variation in equine infectious anemia virus Rev correlates with variable stages of clinical disease in an experimentally infected pony." *Virology* **279**(1): 185-200.
- Belshan, M., M. E. Harris, A. E. Shoemaker, T. J. Hope et S. Carpenter (1998). "Biological characterization of Rev variation in equine infectious anemia virus." *J Virol* **72**(5): 4421-4426.
- Benko, D. M., S. Schwartz, G. N. Pavlakis et B. K. Felber (1990). "A novel human immunodeficiency virus type 1 protein, tev, shares sequences with tat, env, and rev proteins." *J Virol* **64**(6): 2505-2518.

- Berger, E. A., R. W. Doms, E. M. Fenyo, B. T. Korber, D. R. Littman, J. P. Moore, Q. J. Sattentau, H. Schuitemaker, J. Sodroski et R. A. Weiss (1998). "A new classification for HIV-1." *Nature* **391**(6664): 240.
- Berger, J., C. Aepinus, M. Dobrovnik, B. Fleckenstein, J. Hauber et E. Bohnlein (1991). "Mutational analysis of functional domains in the HIV-1 Rev trans-regulatory protein." *Virology* **183**(2): 630-635.
- Berkhout, B., N. L. Vastenhouw, B. I. Klasens et H. Huthoff (2001). "Structural features in the HIV-1 repeat region facilitate strand transfer during reverse transcription." *Rna* **7**(8): 1097-1114.
- Bertrand, L. et A. Pearson (2008). "The conserved N-terminal domain of herpes simplex virus 1 UL24 protein is sufficient to induce the spatial redistribution of nucleolin." *J Gen Virol* **89**(Pt 5): 1142-1151.
- Bhatia, S., R. Sood, A. K. Bhatia, B. Pattnaik et H. K. Pradhan (2008). "Development of a capsid based competitive inhibition enzyme-linked immunosorbent assay for detection of bovine immunodeficiency virus antibodies in cattle and buffalo serum." *J Virol Methods* **148**(1-2): 218-225.
- Bian, X. L., G. Rosas-Acosta, Y. C. Wu et V. G. Wilson (2007). "Nuclear import of bovine papillomavirus type 1 E1 protein is mediated by multiple alpha importins and is negatively regulated by phosphorylation near a nuclear localization signal." *J Virol* **81**(6): 2899-2908.
- Bieniasz, P. D., T. A. Grdina, H. P. Bogerd et B. R. Cullen (1998). "Recruitment of a protein complex containing Tat and cyclin T1 to TAR governs the species specificity of HIV-1 Tat." *Embo J* **17**(23): 7056-7065.
- Blissenbach, M., B. Grewe, B. Hoffmann, S. Brandt et K. Uberla (2010). "Nuclear RNA export and packaging functions of HIV-1 Rev revisited." *J Virol* **84**(13): 6598-6604.
- Boese, A., U. Galli, M. Geyer, M. Sauter et N. Mueller-Lantzsch (2001). "The Rev/Rex homolog HERV-K cORF multimerizes via a C-terminal domain." *FEBS Lett* **493**(2-3): 117-121.
- Bogerd, H. et W. C. Greene (1993). "Dominant negative mutants of human T-cell leukemia virus type I Rex and human immunodeficiency virus type 1 Rev fail to multimerize in vivo." *J Virol* **67**(5): 2496-2502.
- Bogerd, H. P., A. Echarri, T. M. Ross et B. R. Cullen (1998). "Inhibition of human immunodeficiency virus Rev and human T-cell leukemia virus Rex function, but not Mason-Pfizer monkey virus constitutive transport element activity, by a mutant human nucleoporin targeted to Crm1." *J Virol* **72**(11): 8627-8635.
- Bogerd, H. P., H. L. Wiegand, P. D. Bieniasz et B. R. Cullen (2000). "Functional differences between human and bovine immunodeficiency virus Tat transcription factors." *J Virol* **74**(10): 4666-4671.
- Bohnlein, E., J. Berger et J. Hauber (1991). "Functional mapping of the human immunodeficiency virus type 1 Rev RNA binding domain: new insights into the domain structure of Rev and Rex." *J Virol* **65**(12): 7051-7055.

- Boisvert, F. M., S. van Koningsbruggen, J. Navascues et A. I. Lamond (2007). "The multifunctional nucleolus." Nat Rev Mol Cell Biol **8**(7): 574-585.
- Boivin, S. et D. J. Hart (2011). "Interaction of the influenza A virus polymerase PB2 C-terminal region with importin {alpha} isoforms provides insights into host adaptation and polymerase assembly." J Biol Chem.
- Bolinger, C. et K. Boris-Lawrie (2009). "Mechanisms employed by retroviruses to exploit host factors for translational control of a complicated proteome." Retrovirology **6**: 8.
- Borrow, P., H. Lewicki, X. Wei, M. S. Horwitz, N. Pfeffer, H. Meyers, J. A. Nelson, J. E. Gairin, B. H. Hahn, M. B. Oldstone et G. M. Shaw (1997). "Antiviral pressure exerted by HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes (CTLs) during primary infection demonstrated by rapid selection of CTL escape virus." Nat Med **3**(2): 205-211.
- Bose, S., M. Basu et A. K. Banerjee (2004). "Role of nucleolin in human parainfluenza virus type 3 infection of human lung epithelial cells." J Virol **78**(15): 8146-8158.
- Bouillant, A. M., G. M. Ruckerbauer et K. H. Nielsen (1989). "Replication of the bovine immunodeficiency-like virus in diploid and aneuploid cells: permanent, latent and virus-productive infections in vitro." Res Virol **140**(6): 511-529.
- Boyer, P. L., A. L. Ferris et S. H. Hughes (1992). "Mutational analysis of the fingers domain of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase." J Virol **66**(12): 7533-7537.
- Boyne, J. R., B. R. Jackson, A. Taylor, S. A. Macnab et A. Whitehouse (2010). "Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus ORF57 protein interacts with PYM to enhance translation of viral intronless mRNAs." Embo J **29**(11): 1851-1864.
- Boyne, J. R. et A. Whitehouse (2006). "Nucleolar trafficking is essential for nuclear export of intronless herpesvirus mRNA." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(41): 15190-15195.
- Brandt, S., M. Blissenbach, B. Grewe, R. Konietzny, T. Grunwald et K. Uberla (2007). "Rev proteins of human and simian immunodeficiency virus enhance RNA encapsidation." PLoS Pathog **3**(4): e54.
- Braun, M. J., S. Lahn, A. L. Boyd, T. A. Kost, K. Nagashima et M. A. Gonda (1988). "Molecular cloning of biologically active proviruses of bovine immunodeficiency-like virus." Virology **167**(2): 515-523.
- Bray, M., S. Prasad, J. W. Dubay, E. Hunter, K. T. Jeang, D. Rekosh et M. L. Hammariskjold (1994). "A small element from the Mason-Pfizer monkey virus genome makes human immunodeficiency virus type 1 expression and replication Rev-independent." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(4): 1256-1260.
- Brice, P. C., A. C. Kelley et P. J. Butler (1999). "Sensitive in vitro analysis of HIV-1 Rev multimerization." Nucleic Acids Res **27**(10): 2080-2085.
- Brownlie, J., M. E. Collins et P. Heaton (1994). "Bovine immunodeficiency-like virus--a potential cause of disease in cattle?" Vet Rec **134**(12): 289-291.

- Brujeni, G. N., T. T. Poorbazargani, S. Nadin-Davis, M. Toloie et N. Barjesteh (2010). "Bovine immunodeficiency virus and bovine leukemia virus and their mixed infection in Iranian Holstein cattle." *J Infect Dev Ctries* **4**(9): 576-579.
- Bukrinskaya, A. G. (2004). "HIV-1 assembly and maturation." *Arch Virol* **149**(6): 1067-1082.
- Buonaguro, L., G. Barillari, H. K. Chang, C. A. Bohan, V. Kao, R. Morgan, R. C. Gallo et B. Ensoli (1992). "Effects of the human immunodeficiency virus type 1 Tat protein on the expression of inflammatory cytokines." *J Virol* **66**(12): 7159-7167.
- Burke, D. S. (1997). "Recombination in HIV: an important viral evolutionary strategy." *Emerg Infect Dis* **3**(3): 253-259.
- Burns, D. P. et R. C. Desrosiers (1994). "Envelope sequence variation, neutralizing antibodies, and primate lentivirus persistence." *Curr Top Microbiol Immunol* **188**: 185-219.
- Bushman, F. D. (2002). "Integration site selection by lentiviruses: biology and possible control." *Curr Top Microbiol Immunol* **261**: 165-177.
- Butler, S. L., M. S. Hansen et F. D. Bushman (2001). "A quantitative assay for HIV DNA integration in vivo." *Nat Med* **7**(5): 631-634.
- Calabro, V., M. D. Daugherty et A. D. Frankel (2005). "A single intermolecular contact mediates intramolecular stabilization of both RNA and protein." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(19): 6849-6854.
- Calattini, S., E. Nerrienet, P. Mauclore, M. C. Georges-Courbot, A. Saib et A. Gessain (2006). "Detection and molecular characterization of foamy viruses in Central African chimpanzees of the Pan troglodytes troglodytes and Pan troglodytes vellerosus subspecies." *J Med Primatol* **35**(2): 59-66.
- Canto-Nogues, C., D. Hockley, C. Grief, S. Ranjbar, J. Bootman, N. Almond et I. Herrera (2001). "Ultrastructural localization of the RNA of immunodeficiency viruses using electron microscopy in situ hybridization and in vitro infected lymphocytes." *Micron* **32**(6): 579-589.
- Carpenter, S., L. D. Miller, S. Alexandersen, C. A. Whetstone, M. J. VanDerMaaten, B. Viuff, Y. Wannemuehler, J. M. Miller et J. A. Roth (1992). "Characterization of early pathogenic effects after experimental infection of calves with bovine immunodeficiency-like virus." *J Virol* **66**(2): 1074-1083.
- Carpenter, S., S. A. Nadin-Davis, Y. Wannemuehler et J. A. Roth (1993). "Identification of transactivation-response sequences in the long terminal repeat of bovine immunodeficiency-like virus." *J Virol* **67**(7): 4399-4403.
- Carter, C. A. et L. S. Ehrlich (2008). "Cell biology of HIV-1 infection of macrophages." *Annu Rev Microbiol* **62**: 425-443.
- Cassany, A. et L. Gerace (2009). "Reconstitution of nuclear import in permeabilized cells." *Methods Mol Biol* **464**: 181-205.
- Chadwick, B. J., R. J. Coelen, L. M. Sammels, G. Kertayadnya et G. E. Wilcox (1995a). "Genomic sequence analysis identifies Jembrana disease virus as a new bovine lentivirus." *J Gen Virol* **76** (Pt 1): 189-192.

- Chadwick, B. J., R. J. Coelen, G. E. Wilcox, L. M. Sammels et G. Kertayadnya (1995b). "Nucleotide sequence analysis of Jembrana disease virus: a bovine lentivirus associated with an acute disease syndrome." *J Gen Virol* **76** (Pt 7): 1637-1650.
- Chakrabarti, L., M. Guyader, M. Alizon, M. D. Daniel, R. C. Desrosiers, P. Tiollais et P. Sonigo (1987). "Sequence of simian immunodeficiency virus from macaque and its relationship to other human and simian retroviruses." *Nature* **328**(6130): 543-547.
- Chakrabarti, L. A. et V. Simon (2010). "Immune mechanisms of HIV control." *Curr Opin Immunol* **22**(4): 488-496.
- Charpentier, B., F. Stutz et M. Rosbash (1997). "A dynamic in vivo view of the HIV-I Rev-RRE interaction." *J Mol Biol* **266**(5): 950-962.
- Chen, D., M. Wang, S. Zhou et Q. Zhou (2002). "HIV-1 Tat targets microtubules to induce apoptosis, a process promoted by the pro-apoptotic Bcl-2 relative Bim." *Embo J* **21**(24): 6801-6810.
- Chen, H., G. Wilcox, G. Kertayadnya et C. Wood (1999). "Characterization of the Jembrana disease virus tat gene and the cis- and trans-regulatory elements in its long terminal repeats." *J Virol* **73**(1): 658-666.
- Chen, L. et A. D. Frankel (1994). "An RNA-binding peptide from bovine immunodeficiency virus Tat protein recognizes an unusual RNA structure." *Biochemistry* **33**(9): 2708-2715.
- Cherepanov, P. (2007). "LEDGF/p75 interacts with divergent lentiviral integrases and modulates their enzymatic activity in vitro." *Nucleic Acids Res* **35**(1): 113-124.
- Chirmule, N. et S. Pahwa (1996). "Envelope glycoproteins of human immunodeficiency virus type 1: profound influences on immune functions." *Microbiol Rev* **60**(2): 386-406.
- Chiu, T. K. et D. R. Davies (2004). "Structure and function of HIV-1 integrase." *Curr Top Med Chem* **4**(9): 965-977.
- Chook, Y. M. et K. E. Suel (2010). "Nuclear import by karyopherin-betas: Recognition and inhibition." *Biochim Biophys Acta*.
- Christian, S., J. Pilch, M. E. Akerman, K. Porkka, P. Laakkonen et E. Ruoslahti (2003). "Nucleolin expressed at the cell surface is a marker of endothelial cells in angiogenic blood vessels." *J Cell Biol* **163**(4): 871-878.
- Cingolani, G., J. Bednenko, M. T. Gillespie et L. Gerace (2002). "Molecular basis for the recognition of a nonclassical nuclear localization signal by importin beta." *Mol Cell* **10**(6): 1345-1353.
- Clapham, P. R. et A. McKnight (2002). "Cell surface receptors, virus entry and tropism of primate lentiviruses." *J Gen Virol* **83**(Pt 8): 1809-1829.
- Clements, J. E. et M. C. Zink (1996). "Molecular biology and pathogenesis of animal lentivirus infections." *Clin Microbiol Rev* **9**(1): 100-117.

- Cochrane, A. W., A. Perkins et C. A. Rosen (1990). "Identification of sequences important in the nucleolar localization of human immunodeficiency virus Rev: relevance of nucleolar localization to function." *J Virol* **64**(2): 881-885.
- Coffin JM, H. S., Varmus HE (1997). *Retroviruses*. New York, Cold Spring Harbor Press.
- Cojocariu, M., M. C. St-Louis et D. Archambault (2009). "Bovine immunodeficiency virus: identification of a long terminal repeat sequence with enhanced promoter activity." *Arch Virol*.
- Cole, J. L., J. D. Gehman, J. A. Shafer et L. C. Kuo (1993). "Solution oligomerization of the rev protein of HIV-1: implications for function." *Biochemistry* **32**(44): 11769-11775.
- Colvin, R. A. et M. A. Garcia-Blanco (1992). "Unusual structure of the human immunodeficiency virus type 1 trans-activation response element." *J Virol* **66**(2): 930-935.
- Cook, A., F. Bono, M. Jinek et E. Conti (2007). "Structural biology of nucleocytoplasmic transport." *Annu Rev Biochem* **76**: 647-671.
- Cook, A. G. et E. Conti (2010). "Nuclear export complexes in the frame." *Curr Opin Struct Biol* **20**(2): 247-252.
- Cook, K. S., G. J. Fisk, J. Hauber, N. Usman, T. J. Daly et J. R. Rusche (1991). "Characterization of HIV-1 REV protein: binding stoichiometry and minimal RNA substrate." *Nucleic Acids Res* **19**(7): 1577-1583.
- Cooper, C. R., L. A. Hanson, W. J. Diehl, G. T. Pharr et K. S. Coats (1999). "Natural selection of the Pol gene of bovine immunodeficiency virus." *Virology* **255**(2): 294-301.
- Corredor, A. G., M. C. St-Louis et D. Archambault (2010). "Molecular and biological aspects of the bovine immunodeficiency virus." *Curr HIV Res* **8**(1): 2-13.
- Cullen, B. R. (1991). "Regulation of HIV-1 gene expression." *Faseb J* **5**(10): 2361-2368.
- Cullen, B. R. (1998). "Retroviruses as model systems for the study of nuclear RNA export pathways." *Virology* **249**(2): 203-210.
- Cullen, B. R. (2003). "Nuclear mRNA export: insights from virology." *Trends Biochem Sci* **28**(8): 419-424.
- Cullen, B. R. et W. C. Greene (1989). "Regulatory pathways governing HIV-1 replication." *Cell* **58**(3): 423-426.
- D'Orso, I. et A. D. Frankel (2009). "Tat acetylation modulates assembly of a viral-host RNA-protein transcription complex." *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(9): 3101-3106.
- Daelemans, D., S. V. Costes, E. H. Cho, R. A. Erwin-Cohen, S. Lockett et G. N. Pavlakis (2004). "In vivo HIV-1 Rev multimerization in the nucleolus and cytoplasm identified by fluorescence resonance energy transfer." *J Biol Chem* **279**(48): 50167-50175.

- Daelemans, D., S. V. Costes, S. Lockett et G. N. Pavlakis (2005). "Kinetic and molecular analysis of nuclear export factor CRM1 association with its cargo in vivo." *Mol Cell Biol* **25**(2): 728-739.
- Daly, T. J., K. S. Cook, G. S. Gray, T. E. Maione et J. R. Rusche (1989). "Specific binding of HIV-1 recombinant Rev protein to the Rev-responsive element in vitro." *Nature* **342**(6251): 816-819.
- Daly, T. J., R. C. Doten, P. Rennert, M. Auer, H. Jaksche, A. Donner, G. Fisk et J. R. Rusche (1993). "Biochemical characterization of binding of multiple HIV-1 Rev monomeric proteins to the Rev responsive element." *Biochemistry* **32**(39): 10497-10505.
- Dang, C. V. et W. M. Lee (1989). "Nuclear and nucleolar targeting sequences of c-erb-A, c-myc, N-myc, p53, HSP70, and HIV tat proteins." *J Biol Chem* **264**(30): 18019-18023.
- Das, C., S. P. Edgcomb, R. Peteranderl, L. Chen et A. D. Frankel (2004). "Evidence for conformational flexibility in the Tat-TAR recognition motif of cyclin T1." *Virology* **318**(1): 306-317.
- Daugherty, M. D., D. S. Booth, B. Jayaraman, Y. Cheng et A. D. Frankel (2010). "HIV Rev response element (RRE) directs assembly of the Rev homooligomer into discrete asymmetric complexes." *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(28): 12481-12486.
- Daugherty, M. D., I. D'Orso et A. D. Frankel (2008). "A solution to limited genomic capacity: using adaptable binding surfaces to assemble the functional HIV Rev oligomer on RNA." *Mol Cell* **31**(6): 824-834.
- Daugherty, M. D., B. Liu et A. D. Frankel (2010). "Structural basis for cooperative RNA binding and export complex assembly by HIV Rev." *Nat Struct Mol Biol* **17**(11): 1337-1342.
- Dayton, E. T., D. A. Konings, D. M. Powell, B. A. Shapiro, L. Butini, J. V. Maizel et A. I. Dayton (1992). "Extensive sequence-specific information throughout the CAR/RRE, the target sequence of the human immunodeficiency virus type 1 Rev protein." *J Virol* **66**(2): 1139-1151.
- de Mareuil, J., M. Carre, P. Barbier, G. R. Campbell, S. Lancelot, S. Opi, D. Esquieu, J. D. Watkins, C. Prevot, D. Braguer, V. Peyrot et E. P. Loret (2005). "HIV-1 Tat protein enhances microtubule polymerization." *Retrovirology* **2**: 5.
- de Verdugo, U. R., H. C. Selinka, M. Huber, B. Kramer, J. Kellermann, P. H. Hofschneider et R. Kandolf (1995). "Characterization of a 100-kilodalton binding protein for the six serotypes of coxsackie B viruses." *J Virol* **69**(11): 6751-6757.
- Deng, G., W. Qiao, Y. Su, R. Sha, Y. Geng et Q. Chen (2006). "Internalization of Jembrana disease virus Tat: possible pathway and implication." *Virus Res* **121**(2): 122-133.
- Deng, G., Y. Su, J. Mu, R. Sha, Y. Geng, W. Qiao et Q. Chen (2008). "Molecular basis of the internalization of bovine immunodeficiency virus Tat protein." *Virus Genes* **36**(1): 85-94.

- Desrosiers, R. C. (2007). Nonhuman Lentiviruses. *Fields Virology*. D. M. H. P. M. Kinipe, Lippincott Williams and Wilkins. **2**: 2216-2243.
- Ding, Q., L. Zhao, H. Guo et A. C. Zheng (2010). "The nucleocytoplasmic transport of viral proteins." *Virol Sin* **25**(2): 79-85.
- Dingwall, C. et R. A. Laskey (1991). "Nuclear targeting sequences--a consensus?" *Trends Biochem Sci* **16**(12): 478-481.
- Dong, X., A. Biswas, K. E. Suel, L. K. Jackson, R. Martinez, H. Gu et Y. M. Chook (2009). "Structural basis for leucine-rich nuclear export signal recognition by CRM1." *Nature* **458**(7242): 1136-1141.
- Dove, B. K., J. H. You, M. L. Reed, S. R. Emmett, G. Brooks et J. A. Hiscox (2006). "Changes in nucleolar morphology and proteins during infection with the coronavirus infectious bronchitis virus." *Cell Microbiol* **8**(7): 1147-1157.
- Dundr, M., G. H. Leno, M. L. Hammariskjold, D. Rekosh, C. Helga-Maria et M. O. Olson (1995). "The roles of nucleolar structure and function in the subcellular location of the HIV-1 Rev protein." *J Cell Sci* **108** (Pt 8): 2811-2823.
- Dundr, M., G. H. Leno, N. Lewis, D. Rekosh, M. L. Hammariskjold et M. O. Olson (1996). "Location of the HIV-1 Rev protein during mitosis: inactivation of the nuclear export signal alters the pathway for postmitotic reentry into nucleoli." *J Cell Sci* **109** (Pt 9): 2239-2251.
- Dundr, M., T. Misteli et M. O. Olson (2000). "The dynamics of postmitotic reassembly of the nucleolus." *J Cell Biol* **150**(3): 433-446.
- Edgcomb, S. P., A. Aschrafi, E. Kompfner, J. R. Williamson, L. Gerace et M. Hennig (2008). "Protein structure and oligomerization are important for the formation of export-competent HIV-1 Rev-RRE complexes." *Protein Sci* **17**(3): 420-430.
- Efthymiadis, A., L. J. Briggs et D. A. Jans (1998). "The HIV-1 Tat nuclear localization sequence confers novel nuclear import properties." *J Biol Chem* **273**(3): 1623-1628.
- Elder, J. H., D. L. Lerner, C. S. Hasselkus-Light, D. J. Fontenot, E. Hunter, P. A. Luciw, R. C. Montelaro et T. R. Phillips (1992). "Distinct subsets of retroviruses encode dUTPase." *J Virol* **66**(3): 1791-1794.
- Emmott, E., B. K. Dove, G. Howell, L. A. Chappell, M. L. Reed, J. R. Boyne, J. H. You, G. Brooks, A. Whitehouse et J. A. Hiscox (2008). "Viral nucleolar localisation signals determine dynamic trafficking within the nucleolus." *Virology* **380**(2): 191-202.
- Emmott, E. et J. A. Hiscox (2009). "Nucleolar targeting: the hub of the matter." *EMBO Rep* **10**(3): 231-238.
- Engelman, A. et P. Cherepanov (2008). "The lentiviral integrase binding protein LEDGF/p75 and HIV-1 replication." *PLoS Pathog* **4**(3): e1000046.
- Ensoli, B., L. Buonaguro, G. Barillari, V. Fiorelli, R. Gendelman, R. A. Morgan, P. Wingfield et R. C. Gallo (1993). "Release, uptake, and effects of extracellular human immunodeficiency virus type 1 Tat protein on cell growth and viral transactivation." *J Virol* **67**(1): 277-287.

- Fagerlund, R., K. Melen, X. Cao et I. Julkunen (2008). "NF-kappaB p52, RelB and c-Rel are transported into the nucleus via a subset of importin alpha molecules." Cell Signal **20**(8): 1442-1451.
- Fang, J., S. Kubota et R. J. Pomerantz (2002). "A trans-dominant negative HIV type 1 Rev with intact domains of NLS/NOS and NES." AIDS Res Hum Retroviruses **18**(10): 705-709.
- Fankhauser, C., E. Izaurralde, Y. Adachi, P. Wingfield et U. K. Laemmli (1991). "Specific complex of human immunodeficiency virus type 1 rev and nucleolar B23 proteins: dissociation by the Rev response element." Mol Cell Biol **11**(5): 2567-2575.
- Feng, S. et E. C. Holland (1988). "HIV-1 tat trans-activation requires the loop sequence within tar." Nature **334**(6178): 165-167.
- Fischer, U., J. Huber, W. C. Boelens, I. W. Mattaj et R. Luhrmann (1995). "The HIV-1 Rev activation domain is a nuclear export signal that accesses an export pathway used by specific cellular RNAs." Cell **82**(3): 475-483.
- Fischer, U., S. Meyer, M. Teufel, C. Heckel, R. Luhrmann et G. Rautmann (1994). "Evidence that HIV-1 Rev directly promotes the nuclear export of unspliced RNA." Embo J **13**(17): 4105-4112.
- Flaming, K., M. van der Maaten, C. Whetstone, S. Carpenter, D. Frank et J. Roth (1993). "Effect of bovine immunodeficiency-like virus infection on immune function in experimentally infected cattle." Vet Immunol Immunopathol **36**(2): 91-105.
- Flaming, K. P., D. E. Frank, S. Carpenter et J. A. Roth (1997). "Longitudinal studies of immune function in cattle experimentally infected with bovine immunodeficiency-like virus and/or bovine leukemia virus." Vet Immunol Immunopathol **56**(1-2): 27-38.
- Foley, B. T. (2000). An overview of the molecular phylogeny of lentiviruses. HIV Sequence Compendium 2000. M. F. Kuiken C, Foley B, Mellors JW, Hahn B, Mullins J, Marx P, Wolinsky S. . Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, NM., Theoretical Biology and Biophysics Group: 35-43.
- Fong, S. E., J. D. Greenwood, J. C. Williamson, D. Derse, L. A. Pallansch, T. Copeland, L. Rasmussen, A. Mentzer, K. Nagashima, G. Tobin et M. A. Gonda (1997). "Bovine immunodeficiency virus tat gene: cloning of two distinct cDNAs and identification, characterization, and immunolocalization of the tat gene products." Virology **233**(2): 339-357.
- Fong, S. E., L. A. Pallansch, J. A. Mikovits, C. S. Lackman-Smith, F. W. Ruscetti et M. A. Gonda (1995). "cis-acting regulatory elements in the bovine immunodeficiency virus long terminal repeat." Virology **209**(2): 604-614.
- Fornerod, M., M. Ohno, M. Yoshida et I. W. Mattaj (1997). "CRM1 is an export receptor for leucine-rich nuclear export signals." Cell **90**(6): 1051-1060.

- Forshey, B. M., U. von Schwedler, W. I. Sundquist et C. Aiken (2002). "Formation of a human immunodeficiency virus type 1 core of optimal stability is crucial for viral replication." *J Virol* **76**(11): 5667-5677.
- Fouts, D. E., H. L. True, K. A. Cengel et D. W. Celler (1997). "Site-specific phosphorylation of the human immunodeficiency virus type-1 Rev protein accelerates formation of an efficient RNA-binding conformation." *Biochemistry* **36**(43): 13256-13262.
- Frankel, A. D. et C. O. Pabo (1988). "Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus." *Cell* **55**(6): 1189-1193.
- Fujinaga, K., T. P. Cujec, J. Peng, J. Garriga, D. H. Price, X. Grana et B. M. Peterlin (1998). "The ability of positive transcription elongation factor B to transactivate human immunodeficiency virus transcription depends on a functional kinase domain, cyclin T1, and Tat." *J Virol* **72**(9): 7154-7159.
- Futaki, S., T. Suzuki, W. Ohashi, T. Yagami, S. Tanaka, K. Ueda et Y. Sugiura (2001). "Arginine-rich peptides. An abundant source of membrane-permeable peptides having potential as carriers for intracellular protein delivery." *J Biol Chem* **276**(8): 5836-5840.
- Gabriel, G., K. Klingel, A. Otte, S. Thiele, B. Hudjetz, G. Arman-Kalcek, M. Sauter, T. Schmidt, F. Rother, S. Baumgarte, B. Keiner, E. Hartmann, M. Bader, G. G. Brownlee, E. Fodor et H. D. Klenk (2011). "Differential use of importin- α isoforms governs cell tropism and host adaptation of influenza virus." *Nat Commun* **2**(1): 156.
- Gaines, H., M. von Sydow, A. Sonnerborg, J. Albert, J. Czajkowski, P. O. Pehrson, F. Chiodi, L. Moberg, E. M. Fenyo, B. Asjo et al. (1987). "Antibody response in primary human immunodeficiency virus infection." *Lancet* **1**(8544): 1249-1253.
- Galati, D., M. Paiardini, B. Cervasi, H. Albrecht, M. Bocchino, A. Costantini, M. Montroni, M. Magnani, G. Piedimonte et G. Silvestri (2003). "Specific changes in the posttranslational regulation of nucleolin in lymphocytes from patients infected with human immunodeficiency virus." *J Infect Dis* **188**(10): 1483-1491.
- Gallay, P., T. Hope, D. Chin et D. Trono (1997). "HIV-1 infection of nondividing cells through the recognition of integrase by the importin/karyopherin pathway." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(18): 9825-9830.
- Garber, M. E., T. P. Mayall, E. M. Suess, J. Meisenhelder, N. E. Thompson et K. A. Jones (2000). "CDK9 autophosphorylation regulates high-affinity binding of the human immunodeficiency virus type 1 tat-P-TEFb complex to TAR RNA." *Mol Cell Biol* **20**(18): 6958-6969.
- Garcia-Bustos, J. F., P. Wagner et M. N. Hall (1991). "Yeast cell-free nuclear protein import requires ATP hydrolysis." *Exp Cell Res* **192**(1): 213-219.
- Garcia-Martinez, L. F., G. Mavankal, J. M. Neveu, W. S. Lane, D. Ivanov et R. B. Gaynor (1997). "Purification of a Tat-associated kinase reveals a TFIIF complex that modulates HIV-1 transcription." *Embo J* **16**(10): 2836-2850.

- Garvey, K. J., M. S. Oberste, J. E. Elser, M. J. Braun et M. A. Gonda (1990). "Nucleotide sequence and genome organization of biologically active proviruses of the bovine immunodeficiency-like virus." Virology **175**(2): 391-409.
- Gautier, V. W., N. Sheehy, M. Duffy, K. Hashimoto et W. W. Hall (2005). "Direct interaction of the human I-mfa domain-containing protein, HIC, with HIV-1 Tat results in cytoplasmic sequestration and control of Tat activity." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(45): 16362-16367.
- Gheysen, D., E. Jacobs, F. de Foresta, C. Thiriart, M. Francotte, D. Thines et M. De Wilde (1989). "Assembly and release of HIV-1 precursor Pr55gag virus-like particles from recombinant baculovirus-infected insect cells." Cell **59**(1): 103-112.
- Giacca, M. (2005). "HIV-1 Tat, apoptosis and the mitochondria: a tubulin link?" Retrovirology **2**: 7.
- Gifford, R. J., A. Katzourakis, M. Tristem, O. G. Pybus, M. Winters et R. W. Shafer (2008). "A transitional endogenous lentivirus from the genome of a basal primate and implications for lentivirus evolution." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(51): 20362-20367.
- Gillet, N., A. Florins, M. Boxus, C. Burtreau, A. Nigro, F. Vandermeers, H. Balon, A. B. Bouzar, J. Defoiche, A. Burny, M. Reichert, R. Kettmann et L. Willems (2007). "Mechanisms of leukemogenesis induced by bovine leukemia virus: prospects for novel anti-retroviral therapies in human." Retrovirology **4**: 18.
- Goff, S. P. (2007). Retroviridae: The Retroviruses and Their Replication. Fields Virology. D. M. H. Knipe, Peter M., Lippincott Williams and Wilkins. **2**: 2001-2069.
- Golub, E. I., G. G. Li et D. J. Volsky (1990). "Differences in the basal activity of the long terminal repeat determine different replicative capacities of two closely related human immunodeficiency virus type 1 isolates." J Virol **64**(8): 3654-3660.
- Gomez Corredor, A. et D. Archambault (2009). "The bovine immunodeficiency virus rev protein: identification of a novel lentiviral bipartite nuclear localization signal harboring an atypical spacer sequence." J Virol **83**(24): 12842-12853.
- Gomez Corredor, A. a. A. D. (2011). "Nuclear Import and Export of the bovine immunodeficiency virus Rev protein." J Virol: submitted.
- Gonda, M. A. (1992). "Bovine immunodeficiency virus." Aids **6**(8): 759-776.
- Gonda, M. A., M. J. Braun, S. G. Carter, T. A. Kost, J. W. Bess, Jr., L. O. Arthur et M. J. Van der Maaten (1987). "Characterization and molecular cloning of a bovine lentivirus related to human immunodeficiency virus." Nature **330**(6146): 388-391.
- Gonda, M. A., D. G. Luther, S. E. Fong et G. J. Tobin (1994). "Bovine immunodeficiency virus: molecular biology and virus-host interactions." Virus Res **32**(2): 155-181.

- Gonda, M. A., M. S. Oberste, K. J. Garvey, L. A. Pallansch, J. K. Battles, D. Y. Pifat, J. W. Bess, Jr. et K. Nagashima (1990). "Development of the bovine immunodeficiency-like virus as a model of lentivirus disease." Dev Biol Stand **72**: 97-110.
- Gonzalez, E. T., M. Licursi, V. Vila Roza, E. Bonzo, E. Mortola, J. P. Frossard et C. Venables (2007). "Evidence of bovine immunodeficiency virus (BIV) infection: Serological survey in Argentina." Res Vet Sci.
- Gonzalez, E. T., M. Licursi, V. Vila Roza, E. Bonzo, E. Mortola, J. P. Frossard et C. Venables (2008). "Evidence of bovine immunodeficiency virus (BIV) infection: serological survey in Argentina." Res Vet Sci **85**(2): 353-358.
- Gorlich, D., M. Dabrowski, F. R. Bischoff, U. Kutay, P. Bork, E. Hartmann, S. Prehn et E. Izaurralde (1997). "A novel class of RanGTP binding proteins." J Cell Biol **138**(1): 65-80.
- Gorlich, D. et I. W. Mattaj (1996). "Nucleocytoplasmic transport." Science **271**(5255): 1513-1518.
- Gorlich, D., N. Pante, U. Kutay, U. Aebi et F. R. Bischoff (1996). "Identification of different roles for RanGDP and RanGTP in nuclear protein import." Embo J **15**(20): 5584-5594.
- Gradil, C. M., R. E. Watson, R. W. Renshaw, R. O. Gilbert et E. J. Dubovi (1999). "Detection of bovine immunodeficiency virus DNA in the blood and semen of experimentally infected bulls." Vet Microbiol **70**(1-2): 21-31.
- Gragerov, A., T. Kino, G. Ilyina-Gragerova, G. P. Chrousos et G. N. Pavlakis (1998). "HHR23A, the human homologue of the yeast repair protein RAD23, interacts specifically with Vpr protein and prevents cell cycle arrest but not the transcriptional effects of Vpr." Virology **245**(2): 323-330.
- Greco, A. (2009). "Involvement of the nucleolus in replication of human viruses." Rev Med Virol **19**(4): 201-214.
- Green, M. R. et M. L. Zapp (1989). "Human immunodeficiency virus. Revving up gene expression." Nature **338**(6212): 200-201.
- Grewe, B. et K. Uberla (2010). "The human immunodeficiency virus type 1 Rev protein: menage a trois during the early phase of the lentiviral replication cycle." J Gen Virol **91**(Pt 8): 1893-1897.
- Groom, H. C., E. C. Anderson, J. A. Dangerfield et A. M. Lever (2009). "Rev regulates translation of human immunodeficiency virus type 1 RNAs." J Gen Virol **90**(Pt 5): 1141-1147.
- Groom, H. C., E. C. Anderson et A. M. Lever (2009). "Rev: beyond nuclear export." J Gen Virol **90**(Pt 6): 1303-1318.
- Gruter, P., C. Tabernero, C. von Kobbe, C. Schmitt, C. Saavedra, A. Bachi, M. Wilm, B. K. Felber et E. Izaurralde (1998). "TAP, the human homolog of Mex67p, mediates CTE-dependent RNA export from the nucleus." Mol Cell **1**(5): 649-659.
- Gu, L., T. Tsuji, M. A. Jarboui, G. P. Yeo, N. Sheehy, W. W. Hall et V. W. Gautier (2011). "Intermolecular masking of the HIV-1 Rev NLS by the cellular

- protein HIC: Novel insights into the regulation of Rev nuclear import." Retrovirology **8**: 17.
- Gunnery, S., S. R. Green et M. B. Mathews (1992). "Tat-responsive region RNA of human immunodeficiency virus type 1 stimulates protein synthesis in vivo and in vitro: relationship between structure and function." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(23): 11557-11561.
- Guo, X., J. Hu, J. B. Whitney, R. S. Russell et C. Liang (2004). "Important role for the CA-NC spacer region in the assembly of bovine immunodeficiency virus Gag protein." J Virol **78**(2): 551-560.
- Guttler, T., T. Madl, P. Neumann, D. Deichsel, L. Corsini, T. Monecke, R. Ficner, M. Sattler et D. Gorlich (2010). "NES consensus redefined by structures of PKI-type and Rev-type nuclear export signals bound to CRM1." Nat Struct Mol Biol **17**(11): 1367-1376.
- Hahn, M. A. et D. J. Marsh (2007). "Nucleolar localization of parafibromin is mediated by three nucleolar localization signals." FEBS Lett **581**(26): 5070-5074.
- Hakata, Y., M. Yamada, N. Mabuchi et H. Shida (2002). "The carboxy-terminal region of the human immunodeficiency virus type 1 protein Rev has multiple roles in mediating CRM1-related Rev functions." J Virol **76**(16): 8079-8089.
- Harmache, A., M. Bouyac, G. Audoly, C. Hieblot, P. Peveri, R. Vigne et M. Suzan (1995). "The vif gene is essential for efficient replication of caprine arthritis encephalitis virus in goat synovial membrane cells and affects the late steps of the virus replication cycle." J Virol **69**(6): 3247-3257.
- Harris, M. E., R. R. Gontarek, D. Derse et T. J. Hope (1998). "Differential requirements for alternative splicing and nuclear export functions of equine infectious anemia virus Rev protein." Mol Cell Biol **18**(7): 3889-3899.
- Hatanaka, M. (1990). "Discovery of the nucleolar targeting signal." Bioessays **12**(3): 143-148.
- He, L., A. Weber et D. Levens (2000). "Nuclear targeting determinants of the far upstream element binding protein, a c-myc transcription factor." Nucleic Acids Res **28**(22): 4558-4565.
- Heaphy, S., C. Dingwall, I. Ernberg, M. J. Gait, S. M. Green, J. Karn, A. D. Lowe, M. Singh et M. A. Skinner (1990). "HIV-1 regulator of virion expression (Rev) protein binds to an RNA stem-loop structure located within the Rev response element region." Cell **60**(4): 685-693.
- Heger, P., O. Rosorius, C. Koch, G. Casari, R. Grassmann et J. Hauber (1998). "Multimer formation is not essential for nuclear export of human T-cell leukemia virus type 1 Rex trans-activator protein." J Virol **72**(11): 8659-8668.
- Henderson, B. R. et P. Percipalle (1997). "Interactions between HIV Rev and nuclear import and export factors: the Rev nuclear localisation signal mediates specific binding to human importin-beta." J Mol Biol **274**(5): 693-707.

- Hermida-Matsumoto, L. et M. D. Resh (2000). "Localization of human immunodeficiency virus type 1 Gag and Env at the plasma membrane by confocal imaging." *J Virol* **74**(18): 8670-8679.
- Herrmann, C. H. et A. P. Rice (1995). "Lentivirus Tat proteins specifically associate with a cellular protein kinase, TAK, that hyperphosphorylates the carboxyl-terminal domain of the large subunit of RNA polymerase II: candidate for a Tat cofactor." *J Virol* **69**(3): 1612-1620.
- Hiebenthal-Millow, K., T. C. Greenough, D. B. Brettler, M. Schindler, S. Wildum, J. L. Sullivan et F. Kirchhoff (2003). "Alterations in HIV-1 LTR promoter activity during AIDS progression." *Virology* **317**(1): 109-118.
- Hirai, N., H. Kabeya, K. Ohashi, C. Sugimoto et M. Onuma (1996). "Immunomodulative effects of bovine immunodeficiency-like virus (BIV)-infection and mixed infection of BIV and bovine leukemia virus on sheep." *Jpn J Vet Res* **44**(3): 153-163.
- Hirai, N., S. Xuan, K. Ochiai et M. Onuma (1994). "Alteration of immune responses of rabbits infected with bovine immunodeficiency-like virus." *Microbiol Immunol* **38**(12): 943-950.
- Hiscox, J. A. (2007). "RNA viruses: hijacking the dynamic nucleolus." *Nat Rev Microbiol* **5**(2): 119-127.
- Hiscox, J. A., A. Whitehouse et D. A. Matthews (2010). "Nucleolar proteomics and viral infection." *Proteomics* **10**(22): 4077-4086.
- Hoglund, S., A. Ohagen, K. Lawrence et D. Gabuzda (1994). "Role of vif during packing of the core of HIV-1." *Virology* **201**(2): 349-355.
- Holland, S. M., N. Ahmad, R. K. Maitra, P. Wingfield et S. Venkatesan (1990). "Human immunodeficiency virus rev protein recognizes a target sequence in rev-responsive element RNA within the context of RNA secondary structure." *J Virol* **64**(12): 5966-5975.
- Hope, T. J. (1997). "Viral RNA export." *Chem Biol* **4**(5): 335-344.
- Hope, T. J. (1999). "The ins and outs of HIV Rev." *Arch Biochem Biophys* **365**(2): 186-191.
- Hope, T. J., B. L. Bond, D. McDonald, N. P. Klein et T. G. Parslow (1991). "Effector domains of human immunodeficiency virus type 1 Rev and human T-cell leukemia virus type I Rex are functionally interchangeable and share an essential peptide motif." *J Virol* **65**(11): 6001-6007.
- Hope, T. J., X. J. Huang, D. McDonald et T. G. Parslow (1990a). "Steroid-receptor fusion of the human immunodeficiency virus type 1 Rev transactivator: mapping cryptic functions of the arginine-rich motif." *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**(19): 7787-7791.
- Hope, T. J., D. McDonald, X. J. Huang, J. Low et T. G. Parslow (1990b). "Mutational analysis of the human immunodeficiency virus type 1 Rev transactivator: essential residues near the amino terminus." *J Virol* **64**(11): 5360-5366.

- Hoque, M., B. Tian, M. B. Mathews et T. Pe'ery (2005). "Granulin and granulin repeats interact with the Tat.P-TEFb complex and inhibit Tat transactivation." *J Biol Chem* **280**(14): 13648-13657.
- Horke, S., K. Reumann, M. Schweizer, H. Will et T. Heise (2004). "Nuclear trafficking of La protein depends on a newly identified nucleolar localization signal and the ability to bind RNA." *J Biol Chem* **279**(25): 26563-26570.
- Hua, J., J. J. Caffrey et B. R. Cullen (1996). "Functional consequences of natural sequence variation in the activation domain of HIV-1 Rev." *Virology* **222**(2): 423-429.
- Huang, X. J., T. J. Hope, B. L. Bond, D. McDonald, K. Grahl et T. G. Parslow (1991). "Minimal Rev-response element for type 1 human immunodeficiency virus." *J Virol* **65**(4): 2131-2134.
- Huo, L., D. Li, L. Sun, M. Liu, X. Shi, X. Sun, J. Li, B. Dong, X. Dong et J. Zhou (2011). "Tat acetylation regulates its actions on microtubule dynamics and apoptosis in T lymphocytes." *J Pathol* **223**(1): 28-36.
- Hutten, S., S. Walde, C. Spillner, J. Hauber et R. H. Kehlenbach (2009). "The nuclear pore component Nup358 promotes transportin-dependent nuclear import." *J Cell Sci* **122**(Pt 8): 1100-1110.
- Indik, S., W. H. Gunzburg, B. Salmons et F. Rouault (2005). "A novel, mouse mammary tumor virus encoded protein with Rev-like properties." *Virology* **337**(1): 1-6.
- Iosef, C., T. Gkourasas, C. Y. Jia, S. S. Li et V. K. Han (2008). "A functional nuclear localization signal in insulin-like growth factor binding protein-6 mediates its nuclear import." *Endocrinology* **149**(3): 1214-1226.
- Isaacson, J. A., J. A. Roth, C. Wood et S. Carpenter (1995). "Loss of Gag-specific antibody reactivity in cattle experimentally infected with bovine immunodeficiency-like virus." *Viral Immunol* **8**(1): 27-36.
- Jacobs, R. M., F. L. Pollari, W. B. McNab et B. Jefferson (1995). "A serological survey of bovine syncytial virus in Ontario: associations with bovine leukemia and immunodeficiency-like viruses, production records, and management practices." *Can J Vet Res* **59**(4): 271-278.
- Jacobs, R. M., H. E. Smith, C. A. Whetstone, D. L. Suarez, B. Jefferson et V. E. Valli (1994). "Haematological and lymphocyte subset analyses in sheep inoculated with bovine immunodeficiency-like virus." *Vet Res Commun* **18**(6): 471-482.
- Jain, C. et J. G. Belasco (2001). "Structural model for the cooperative assembly of HIV-1 Rev multimers on the RRE as deduced from analysis of assembly-defective mutants." *Mol Cell* **7**(3): 603-614.
- Jans, D. A., T. Moll, K. Nasmyth et P. Jans (1995). "Cyclin-dependent kinase site-regulated signal-dependent nuclear localization of the SW15 yeast transcription factor in mammalian cells." *J Biol Chem* **270**(29): 17064-17067.
- Jeang, K. T., H. Xiao et E. A. Rich (1999). "Multifaceted activities of the HIV-1 transactivator of transcription, Tat." *J Biol Chem* **274**(41): 28837-28840.

- Ji, J. et L. A. Loeb (1994). "Fidelity of HIV-1 reverse transcriptase copying a hypervariable region of the HIV-1 env gene." *Virology* **199**(2): 323-330.
- Kahvejian, A., Y. V. Svitkin, R. Sukarieh, M. N. M'Boutchou et N. Sonenberg (2005). "Mammalian poly(A)-binding protein is a eukaryotic translation initiation factor, which acts via multiple mechanisms." *Genes Dev* **19**(1): 104-113.
- Kalderon, D., B. L. Roberts, W. D. Richardson et A. E. Smith (1984). "A short amino acid sequence able to specify nuclear location." *Cell* **39**(3 Pt 2): 499-509.
- Kalvatchev, Z., R. Walder, M. Barrios et D. Garzaro (1995). "Acquired immune dysfunction in rabbits experimentally infected with an infectious molecular clone of the bovine immunodeficiency virus (BIV127)." *Viral Immunol* **8**(3): 159-164.
- Kalvatchev, Z., R. Walder, F. Perez, D. Garzaro et M. Barrios (1998). "Infection of rabbits with R29 strain of bovine immunodeficiency virus: virulence, immunosuppression, and progressive mesenteric lymphadenopathy." *Viral Immunol* **11**(3): 159-166.
- Kang, Y. et B. R. Cullen (1999). "The human Tap protein is a nuclear mRNA export factor that contains novel RNA-binding and nucleocytoplasmic transport sequences." *Genes Dev* **13**(9): 1126-1139.
- Kashanchi, F., Z. Q. Liu, B. Atkinson et C. Wood (1991). "Comparative evaluation of bovine immunodeficiency-like virus infection by reverse transcriptase and polymerase chain reaction." *J Virol Methods* **31**(2-3): 197-209.
- Katsumoto, T., N. Hattori et T. Kurimura (1987). "Maturation of human immunodeficiency virus, strain LAV, in vitro." *Intervirology* **27**(3): 148-153.
- Kehlenbach Ralph H, P. B. M. (2006). Analysis of Nuclear Protein Import and Export in Digitonine-Permeabilized Cells. *Cell biology: a laboratory handbook* J. Celis, Elsevier Academic. v. **1**: 267-275.
- Kempster, S., M. E. Collins et J. Brownlie (2002). "Tat protein expression in MDBK cells does not confer susceptibility to bovine immunodeficiency virus." *Arch Virol* **147**(3): 643-649.
- Kiernan, R. E., C. Vanhulle, L. Schiltz, E. Adam, H. Xiao, F. Maudoux, C. Calomme, A. Burny, Y. Nakatani, K. T. Jeang, M. Benkirane et C. Van Lint (1999). "HIV-1 tat transcriptional activity is regulated by acetylation." *Embo J* **18**(21): 6106-6118.
- Kim, B. J. et H. Lee (2008). "Caspase-mediated cleavage of importin-alpha increases its affinity for MCM and downregulates DNA synthesis by interrupting the binding of MCM to chromatin." *Biochim Biophys Acta* **1783**(12): 2287-2293.
- Kiss, A., L. Li, T. Gettemeier et L. K. Venkatesh (2003). "Functional analysis of the interaction of the human immunodeficiency virus type 1 Rev nuclear export signal with its cofactors." *Virology* **314**(2): 591-600.
- Kiyomasu, T., T. Miyazawa, T. Furuya, R. Shibata, H. Sakai, J. Sakuragi, M. Fukasawa, N. Maki, A. Hasegawa, T. Mikami et et al. (1991). "Identification of feline immunodeficiency virus rev gene activity." *J Virol* **65**(8): 4539-4542.

- Kjems, J. et P. Askjaer (2000). "Rev protein and its cellular partners." Adv Pharmacol **48**: 251-298.
- Kjems, J., M. Brown, D. D. Chang et P. A. Sharp (1991). "Structural analysis of the interaction between the human immunodeficiency virus Rev protein and the Rev response element." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(3): 683-687.
- Klebe, C., F. R. Bischoff, H. Ponstingl et A. Wittinghofer (1995). "Interaction of the nuclear GTP-binding protein Ran with its regulatory proteins RCC1 and RanGAP1." Biochemistry **34**(2): 639-647.
- Kosugi, S., M. Hasebe, N. Matsumura, H. Takashima, E. Miyamoto-Sato, M. Tomita et H. Yanagawa (2009). "Six classes of nuclear localization signals specific to different binding grooves of importin alpha." J Biol Chem **284**(1): 478-485.
- Kotera, I., T. Sekimoto, Y. Miyamoto, T. Saiwaki, E. Nagoshi, H. Sakagami, H. Kondo et Y. Yoneda (2005). "Importin alpha transports CaMKIV to the nucleus without utilizing importin beta." Embo J **24**(5): 942-951.
- Koyama, M. et Y. Matsuura (2010). "An allosteric mechanism to displace nuclear export cargo from CRM1 and RanGTP by RanBP1." Embo J **29**(12): 2002-2013.
- Krebs, F. C., D. Mehrens, S. Pomeroy, M. M. Goodenow et B. Wigdahl (1998). "Human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat quasispecies differ in basal transcription and nuclear factor recruitment in human glial cells and lymphocytes." J Biomed Sci **5**(1): 31-44.
- Kubota, S. et R. J. Pomerantz (2000). "The nuclear function of the nuclear diffusion inhibitory signal of human immunodeficiency virus type 1: critical roles in dominant nuclear localization and intracellular stability." J Hum Virol **3**(4): 173-181.
- Kubota, S., H. Siomi, T. Satoh, S. Endo, M. Maki et M. Hatanaka (1989). "Functional similarity of HIV-I rev and HTLV-I rex proteins: identification of a new nucleolar-targeting signal in rev protein." Biochem Biophys Res Commun **162**(3): 963-970.
- Kudo, N., N. Matsumori, H. Taoka, D. Fujiwara, E. P. Schreiner, B. Wolff, M. Yoshida et S. Horinouchi (1999). "Leptomycin B inactivates CRM1/exportin 1 by covalent modification at a cysteine residue in the central conserved region." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(16): 9112-9117.
- Kutay, U., F. R. Bischoff, S. Kostka, R. Kraft et D. Gorlich (1997). "Export of importin alpha from the nucleus is mediated by a specific nuclear transport factor." Cell **90**(6): 1061-1071.
- Kutay, U. et S. Guttinger (2005). "Leucine-rich nuclear-export signals: born to be weak." Trends Cell Biol **15**(3): 121-124.
- Kwak, Y. T., D. Ivanov, J. Guo, E. Nee et R. B. Gaynor (1999). "Role of the human and murine cyclin T proteins in regulating HIV-1 tat-activation." J Mol Biol **288**(1): 57-69.

- la Cour, T., L. Kierner, A. Molgaard, R. Gupta, K. Skriver et S. Brunak (2004). "Analysis and prediction of leucine-rich nuclear export signals." Protein Eng Des Sel **17**(6): 527-536.
- Lam, M. H., L. J. Briggs, W. Hu, T. J. Martin, M. T. Gillespie et D. A. Jans (1999). "Importin beta recognizes parathyroid hormone-related protein with high affinity and mediates its nuclear import in the absence of importin alpha." J Biol Chem **274**(11): 7391-7398.
- Lange, A., R. E. Mills, C. J. Lange, M. Stewart, S. E. Devine et A. H. Corbett (2007). "Classical nuclear localization signals: definition, function, and interaction with importin alpha." J Biol Chem **282**(8): 5101-5105.
- Le Grice, S. F. (2003). "In the beginning": initiation of minus strand DNA synthesis in retroviruses and LTR-containing retrotransposons." Biochemistry **42**(49): 14349-14355.
- Lee, J. H., S. C. Murphy, M. Belshan, W. O. Sparks, Y. Wannemuehler, S. Liu, T. J. Hope, D. Dobbs et S. Carpenter (2006). "Characterization of functional domains of equine infectious anemia virus Rev suggests a bipartite RNA-binding domain." J Virol **80**(8): 3844-3852.
- Lee, S. J., T. Sekimoto, E. Yamashita, E. Nagoshi, A. Nakagawa, N. Imamoto, M. Yoshimura, H. Sakai, K. T. Chong, T. Tsukihara et Y. Yoneda (2003). "The structure of importin-beta bound to SREBP-2: nuclear import of a transcription factor." Science **302**(5650): 1571-1575.
- Leonard, J. M., J. W. Abramczuk, D. S. Pezen, R. Rutledge, J. H. Belcher, F. Hakim, G. Shearer, L. Lamperth, W. Travis, T. Fredrickson et et al. (1988). "Development of disease and virus recovery in transgenic mice containing HIV proviral DNA." Science **242**(4886): 1665-1670.
- Levin, A., Z. Hayouka, R. Brack-Werner, D. J. Volsky, A. Friedler et A. Loyter (2009a). "Novel regulation of HIV-1 replication and pathogenicity: Rev inhibition of integration." Protein Eng Des Sel **22**(12): 753-763.
- Levin, A., Z. Hayouka, A. Friedler, R. Brack-Werner, D. J. Volsky et A. Loyter (2010a). "A novel role for the viral Rev protein in promoting resistance to superinfection by human immunodeficiency virus type 1." J Gen Virol **91**(Pt 6): 1503-1513.
- Levin, A., Z. Hayouka, A. Friedler et A. Loyter (2010b). "Nucleocytoplasmic shuttling of HIV-1 integrase is controlled by the viral Rev protein." Nucleus **1**(2): 190-201.
- Levin, A., Z. Hayouka, A. Friedler et A. Loyter (2010c). "Transportin 3 and importin alpha are required for effective nuclear import of HIV-1 integrase in virus-infected cells." Nucleus **1**(5): 422-431.
- Levin, A., Z. Hayouka, M. Helfer, R. Brack-Werner, A. Friedler et A. Loyter (2009b). "Peptides derived from HIV-1 integrase that bind Rev stimulate viral genome integration." PLoS ONE **4**(1): e4155.

- Li, J., H. Tang, T. M. Mullen, C. Westberg, T. R. Reddy, D. W. Rose et F. Wong-Staal (1999). "A role for RNA helicase A in post-transcriptional regulation of HIV type 1." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(2): 709-714.
- Lim, A. C. et J. K. Barton (1997). "Targeting the Tat-binding site of bovine immunodeficiency virus TAR RNA with a shape-selective rhodium complex." Bioorg Med Chem **5**(6): 1131-1136.
- Lin, W., W. Ye, L. Cai, X. Meng, G. Ke, C. Huang, Z. Peng, Y. Yu, J. A. Golden, A. M. Tartakoff et T. Tao (2009). "The roles of multiple importins for nuclear import of murine aristaless-related homeobox protein." J Biol Chem **284**(30): 20428-20439.
- Liu, Z. Q., D. Sheridan et C. Wood (1992). "Identification and characterization of the bovine immunodeficiency-like virus tat gene." J Virol **66**(8): 5137-5140.
- Lohrum, M. A., M. Ashcroft, M. H. Kubbutat et K. H. Vousden (2000). "Identification of a cryptic nucleolar-localization signal in MDM2." Nat Cell Biol **2**(3): 179-181.
- Lott, K., A. Bhardwaj, G. Mitrousis, N. Pante et G. Cingolani (2010). "The importin beta binding domain modulates the avidity of importin beta for the nuclear pore complex." J Biol Chem **285**(18): 13769-13780.
- Luo, J. C. et M. Shibuya (2001). "A variant of nuclear localization signal of bipartite-type is required for the nuclear translocation of hypoxia inducible factors (1alpha, 2alpha and 3alpha)." Oncogene **20**(12): 1435-1444.
- Lustig, B., I. Bahar et R. L. Jernigan (1998). "RNA bulge entropies in the unbound state correlate with peptide binding strengths for HIV-1 and BIV TAR RNA because of improved conformational access." Nucleic Acids Res **26**(22): 5212-5217.
- Lymans'ka, O., M. Rola, L. Byka, I. Kuzmak, L. Volians'kyi Iu, N. B. Puhach, S. V. Novikov et O. P. Lymans'kyi (2007). "[Amplification of proviral DNA of bovine immunodeficiency virus in experimentally infected animals]." Mikrobiol Z **69**(1): 52-60.
- Lymberopoulos, M. H., A. Bourget, N. B. Abdeljelil et A. Pearson (2011). "Involvement of the UL24 protein in herpes simplex virus 1-induced dispersal of B23 and in nuclear egress." Virology **412**(2): 341-348.
- Lymberopoulos, M. H. et A. Pearson (2007). "Involvement of UL24 in herpes-simplex-virus-1-induced dispersal of nucleolin." Virology **363**(2): 397-409.
- Macian, F. et A. Rao (1999). "Reciprocal modulatory interaction between human immunodeficiency virus type 1 Tat and transcription factor NFAT1." Mol Cell Biol **19**(5): 3645-3653.
- Madore, S. J., L. S. Tiley, M. H. Malim et B. R. Cullen (1994). "Sequence requirements for Rev multimerization in vivo." Virology **202**(1): 186-194.
- Magin, C., J. Hesse, J. Lower et R. Lower (2000). "Corf, the Rev/Rex homologue of HTDV/HERV-K, encodes an arginine-rich nuclear localization signal that exerts a trans-dominant phenotype when mutated." Virology **274**(1): 11-16.

- Magin, C., R. Lower et J. Lower (1999). "cORF and RcRE, the Rev/Rex and RRE/RxRE homologues of the human endogenous retrovirus family HTDV/HERV-K." *J Virol* **73**(11): 9496-9507.
- Malim, M. H., S. Bohnlein, R. Fenrick, S. Y. Le, J. V. Maizel et B. R. Cullen (1989a). "Functional comparison of the Rev trans-activators encoded by different primate immunodeficiency virus species." *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**(21): 8222-8226.
- Malim, M. H. et B. R. Cullen (1991). "HIV-1 structural gene expression requires the binding of multiple Rev monomers to the viral RRE: implications for HIV-1 latency." *Cell* **65**(2): 241-248.
- Malim, M. H., J. Hauber, S. Y. Le, J. V. Maizel et B. R. Cullen (1989b). "The HIV-1 rev trans-activator acts through a structured target sequence to activate nuclear export of unspliced viral mRNA." *Nature* **338**(6212): 254-257.
- Malim, M. H., D. F. McCarn, L. S. Tiley et B. R. Cullen (1991). "Mutational definition of the human immunodeficiency virus type 1 Rev activation domain." *J Virol* **65**(8): 4248-4254.
- Malmquist, W. A., M. J. Van der Maaten et A. D. Boothe (1969). "Isolation, immunodiffusion, immunofluorescence, and electron microscopy of a syncytial virus of lymphosarcomatous and apparently normal cattle." *Cancer Res* **29**(1): 188-200.
- Mancebo, H. S., G. Lee, J. Flygare, J. Tomassini, P. Luu, Y. Zhu, J. Peng, C. Blau, D. Hazuda, D. Price et O. Flores (1997). "P-TEFb kinase is required for HIV Tat transcriptional activation in vivo and in vitro." *Genes Dev* **11**(20): 2633-2644.
- Mann, D. A., I. Mikaelian, R. W. Zempel, S. M. Green, A. D. Lowe, T. Kimura, M. Singh, P. J. Butler, M. J. Gait et J. Karn (1994). "A molecular rheostat. Co-operative rev binding to stem I of the rev-response element modulates human immunodeficiency virus type-1 late gene expression." *J Mol Biol* **241**(2): 193-207.
- Mansky, L. M. (1996). "The mutation rate of human immunodeficiency virus type 1 is influenced by the vpr gene." *Virology* **222**(2): 391-400.
- Mansky, L. M. (1998). "Retrovirus mutation rates and their role in genetic variation." *J Gen Virol* **79** (Pt 6): 1337-1345.
- Marchio, S., M. Alfano, L. Primo, D. Gramaglia, L. Butini, L. Gennero, E. De Vivo, W. Arap, M. Giacca, R. Pasqualini et F. Bussolino (2005). "Cell surface-associated Tat modulates HIV-1 infection and spreading through a specific interaction with gp120 viral envelope protein." *Blood* **105**(7): 2802-2811.
- Marsh, J. W. (1999). "The numerous effector functions of Nef." *Arch Biochem Biophys* **365**(2): 192-198.
- Martin, S. J., T. P. O'Neill, J. A. Bilello et J. L. Eiseman (1991). "Lymphocyte transformation abnormalities in bovine immunodeficiency-like virus infected calves." *Immunol Lett* **27**(2): 81-84.

- Martins, L. P., N. Chenciner, B. Asjo, A. Meyerhans et S. Wain-Hobson (1991). "Independent fluctuation of human immunodeficiency virus type 1 rev and gp41 quasispecies in vivo." *J Virol* **65**(8): 4502-4507.
- Matthews, D. A. et M. O. Olson (2006). "What is new in the nucleolus?: workshop on the nucleolus: new perspectives." *EMBO Rep* **7**(9): 870-873.
- Matukonis, M., M. Li, R. P. Molina, B. Paszkiet, M. Kaleko et T. Luo (2002). "Development of second- and third-generation bovine immunodeficiency virus-based gene transfer systems." *Hum Gene Ther* **13**(11): 1293-1303.
- McCloskey, T. W., M. Ott, E. Tribble, S. A. Khan, S. Teichberg, M. O. Paul, S. Pahwa, E. Verdin et N. Chirmule (1997). "Dual role of HIV Tat in regulation of apoptosis in T cells." *J Immunol* **158**(2): 1014-1019.
- McDonald, D., T. J. Hope et T. G. Parslow (1992). "Posttranscriptional regulation by the human immunodeficiency virus type 1 Rev and human T-cell leukemia virus type I Rex proteins through a heterologous RNA binding site." *J Virol* **66**(12): 7232-7238.
- McLane, L. M., K. F. Pulliam, S. E. Devine et A. H. Corbett (2008). "The Ty1 integrase protein can exploit the classical nuclear protein import machinery for entry into the nucleus." *Nucleic Acids Res* **36**(13): 4317-4326.
- McNab, T., M. Desport, W. M. Tenaya, N. Hartaningsih et G. E. Wilcox (2010). "Bovine immunodeficiency virus produces a transient viraemic phase soon after infection in *Bos javanicus*." *Vet Microbiol* **141**(3-4): 216-223.
- McNab, W. B., R. M. Jacobs et H. E. Smith (1994). "A serological survey for bovine immunodeficiency-like virus in Ontario dairy cattle and associations between test results, production records and management practices." *Can J Vet Res* **58**(1): 36-41.
- Meas, S., K. Ohashi, C. Sugimoto et M. Onuma (2001). "Phylogenetic relationships of bovine immunodeficiency virus in cattle and buffaloes based on surface envelope gene sequences. Brief report." *Arch Virol* **146**(5): 1037-1045.
- Meas, S., T. Usui, K. Ohashi, C. Sugimoto et M. Onuma (2002). "Vertical transmission of bovine leukemia virus and bovine immunodeficiency virus in dairy cattle herds." *Vet Microbiol* **84**(3): 275-282.
- Mertz, J. A., M. S. Simper, M. M. Lozano, S. M. Payne et J. P. Dudley (2005). "Mouse mammary tumor virus encodes a self-regulatory RNA export protein and is a complex retrovirus." *J Virol* **79**(23): 14737-14747.
- Michienzi, A., L. Cagnon, I. Bahner et J. J. Rossi (2000). "Ribozyme-mediated inhibition of HIV 1 suggests nucleolar trafficking of HIV-1 RNA." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(16): 8955-8960.
- Mills, N. L., A. A. Shelat et R. K. Guy (2007). "Assay Optimization and Screening of RNA-Protein Interactions by AlphaScreen." *J Biomol Screen* **12**(7): 946-955.
- Mischianti, C., F. Pironi, D. Milani, M. Giacca, P. Mirandola, S. Capitani et G. Zauli (1999). "Extracellular HIV-1 Tat protein differentially activates the JNK and ERK/MAPK pathways in CD4 T cells." *Aids* **13**(13): 1637-1645.

- Miyamoto, Y., M. Hieda, M. T. Harreman, M. Fukumoto, T. Saiwaki, A. E. Hodel, A. H. Corbett et Y. Yoneda (2002). "Importin alpha can migrate into the nucleus in an importin beta- and Ran-independent manner." *Embo J* **21**(21): 5833-5842.
- Moanna, A., R. Dunham, M. Paiardini et G. Silvestri (2005). "CD4+ T-cell depletion in HIV infection: killed by friendly fire?" *Curr HIV/AIDS Rep* **2**(1): 16-23.
- Mohammadi, H., S. Sharif, R. R. Rowland et D. Yoo (2009). "The lactate dehydrogenase-elevating virus capsid protein is a nuclear-cytoplasmic protein." *Arch Virol* **154**(7): 1071-1080.
- Mohr, D., S. Frey, T. Fischer, T. Guttler et D. Gorlich (2009). "Characterisation of the passive permeability barrier of nuclear pore complexes." *Embo J* **28**(17): 2541-2553.
- Molina, R. P., M. Matukonis, B. Paszkiet, J. Zhang, M. Kaleko et T. Luo (2002). "Mapping of the bovine immunodeficiency virus packaging signal and RRE and incorporation into a minimal gene transfer vector." *Virology* **304**(1): 10-23.
- Molina, R. P., H. Q. Ye, J. Brady, J. Zhang, H. Zimmerman, M. Kaleko et T. Luo (2004). "A synthetic Rev-independent bovine immunodeficiency virus-based packaging construct." *Hum Gene Ther* **15**(9): 865-877.
- Monecke, T., T. Guttler, P. Neumann, A. Dickmanns, D. Gorlich et R. Ficner (2009). "Crystal structure of the nuclear export receptor CRM1 in complex with Snurportin1 and RanGTP." *Science* **324**(5930): 1087-1091.
- Mongelard, F. et P. Bouvet (2007). "Nucleolin: a multiFACeTed protein." *Trends Cell Biol* **17**(2): 80-86.
- Moody, C. A., G. T. Pharr, J. Murphey, M. B. Hughlett, C. C. Weaver, P. D. Nelson et K. S. Coats (2002). "Confirmation of vertical transmission of bovine immunodeficiency virus in naturally infected dairy cattle using the polymerase chain reaction." *J Vet Diagn Invest* **14**(2): 113-119.
- Moore, E. C., D. Keil et K. S. Coats (1996). "Thermal inactivation of bovine immunodeficiency virus." *Appl Environ Microbiol* **62**(11): 4280-4283.
- Moore, M. S. et G. Blobel (1992). "The two steps of nuclear import, targeting to the nuclear envelope and translocation through the nuclear pore, require different cytosolic factors." *Cell* **69**(6): 939-950.
- Muhlhauser, P., E. C. Muller, A. Otto et U. Kutay (2001). "Multiple pathways contribute to nuclear import of core histones." *EMBO Rep* **2**(8): 690-696.
- Munro, R., R. Lysons, C. Venables, M. Horigan, M. Jeffrey et M. Dawson (1998). "Lymphadenopathy and non-suppurative meningo-encephalitis in calves experimentally infected with bovine immunodeficiency-like virus (FL112)." *J Comp Pathol* **119**(2): 121-134.
- Nagashunmugam, T., A. Velpandi, T. Otsuka, M. Cartas et A. Srinivasan (1992). "Analysis of the viral determinants underlying replication kinetics and cellular tropism of human immunodeficiency virus." *Pathobiology* **60**(4): 234-245.

- Nakayama, E. E. et T. Shiōda (2010). "Anti-retroviral activity of TRIM5 alpha." Rev Med Virol **20**(2): 77-92.
- Narayan, M., I. Younis, D. M. D'Agostino et P. L. Green (2003). "Functional domain structure of human T-cell leukemia virus type 2 rex." J Virol **77**(23): 12829-12840.
- Narayan, O., J. E. Clements, D. E. Griffin et J. S. Wolinsky (1981). "Neutralizing antibody spectrum determines the antigenic profiles of emerging mutants of visna virus." Infect Immun **32**(3): 1045-1050.
- Nash, J. W., L. A. Hanson et K. St Cyr Coats (1995a). "Bovine immunodeficiency virus in stud bull semen." Am J Vet Res **56**(6): 760-763.
- Nash, J. W., L. A. Hanson et K. St Cyr Coats (1995b). "Detection of bovine immunodeficiency virus in blood and milk-derived leukocytes by use of polymerase chain reaction." Am J Vet Res **56**(4): 445-449.
- Neville, M., F. Stutz, L. Lee, L. I. Davis et M. Rosbash (1997). "The importin-beta family member Crm1p bridges the interaction between Rev and the nuclear pore complex during nuclear export." Curr Biol **7**(10): 767-775.
- Nisole, S., B. Krust et A. G. Hovanessian (2002). "Anchorage of HIV on permissive cells leads to coaggregation of viral particles with surface nucleolin at membrane raft microdomains." Exp Cell Res **276**(2): 155-173.
- Nitahara-Kasahara, Y., M. Kamata, T. Yamamoto, X. Zhang, Y. Miyamoto, K. Muneta, S. Iijima, Y. Yoneda, Y. Tsunetsugu-Yokota et Y. Aida (2007). "Novel nuclear import of Vpr promoted by importin alpha is crucial for human immunodeficiency virus type 1 replication in macrophages." J Virol **81**(10): 5284-5293.
- Nosaka, T., H. Siomi, Y. Adachi, M. Ishibashi, S. Kubota, M. Maki et M. Hatanaka (1989). "Nucleolar targeting signal of human T-cell leukemia virus type I rex-encoded protein is essential for cytoplasmic accumulation of unspliced viral mRNA." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(24): 9798-9802.
- Nosaka, T., T. Takamatsu, Y. Miyazaki, K. Sano, A. Sato, S. Kubota, M. Sakurai, Y. Ariumi, M. Nakai, S. Fujita et et al. (1993). "Cytotoxic activity of rev protein of human immunodeficiency virus type 1 by nucleolar dysfunction." Exp Cell Res **209**(1): 89-102.
- Oberste, M. S. et M. A. Gonda (1992). "Conservation of amino-acid sequence motifs in lentivirus Vif proteins." Virus Genes **6**(1): 95-102.
- Oberste, M. S., J. D. Greenwood et M. A. Gonda (1991). "Analysis of the transcription pattern and mapping of the putative rev and env splice junctions of bovine immunodeficiency-like virus." J Virol **65**(7): 3932-3937.
- Oberste, M. S., J. C. Williamson, J. D. Greenwood, K. Nagashima, T. D. Copeland et M. A. Gonda (1993). "Characterization of bovine immunodeficiency virus rev cDNAs and identification and subcellular localization of the Rev protein." J Virol **67**(11): 6395-6405.

- Ogert, R. A., L. H. Lee et K. L. Beemon (1996). "Avian retroviral RNA element promotes unspliced RNA accumulation in the cytoplasm." *J Virol* **70**(6): 3834-3843.
- Okamoto, H., C. T. Sheline, J. L. Corden, K. A. Jones et B. M. Peterlin (1996). "Trans-activation by human immunodeficiency virus Tat protein requires the C-terminal domain of RNA polymerase II." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(21): 11575-11579.
- Olsen, H. S., A. W. Cochrane, P. J. Dillon, C. M. Nalin et C. A. Rosen (1990). "Interaction of the human immunodeficiency virus type 1 Rev protein with a structured region in env mRNA is dependent on multimer formation mediated through a basic stretch of amino acids." *Genes Dev* **4**(8): 1357-1364.
- Onuma, M., E. Koomoto, H. Furuyama, Y. Yasutomi, H. Taniyama, H. Iwai et Y. Kawakami (1992). "Infection and dysfunction of monocytes induced by experimental inoculation of calves with bovine immunodeficiency-like virus." *J Acquir Immune Defic Syndr* **5**(10): 1009-1015.
- Onuma, M., M. Wada, Y. Yasutomi, M. Yamamoto, H. M. Okada et Y. Kawakami (1990). "Suppression of immunological responses in rabbits experimentally infected with bovine leukemia virus." *Vet Microbiol* **25**(2-3): 131-141.
- Ossareh-Nazari, B., F. Bachelierie et C. Dargemont (1997). "Evidence for a role of CRM1 in signal-mediated nuclear protein export." *Science* **278**(5335): 141-144.
- Otero, G. C., M. E. Harris, J. E. Donello et T. J. Hope (1998). "Leptomycin B inhibits equine infectious anemia virus Rev and feline immunodeficiency virus rev function but not the function of the hepatitis B virus posttranscriptional regulatory element." *J Virol* **72**(9): 7593-7597.
- Pallansch, L. A., C. S. Lackman-Smith et M. A. Gonda (1992). "Bovine immunodeficiency-like virus encodes factors which trans activate the long terminal repeat." *J Virol* **66**(5): 2647-2652.
- Palmeri, D. et M. H. Malim (1999). "Importin beta can mediate the nuclear import of an arginine-rich nuclear localization signal in the absence of importin alpha." *Mol Cell Biol* **19**(2): 1218-1225.
- Pasquinelli, A. E., M. A. Powers, E. Lund, D. Forbes et J. E. Dahlberg (1997). "Inhibition of mRNA export in vertebrate cells by nuclear export signal conjugates." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(26): 14394-14399.
- Patenaude, A. M., A. Orthwein, Y. Hu, V. A. Campo, B. Kavli, A. Buschiazzi et J. M. Di Noia (2009). "Active nuclear import and cytoplasmic retention of activation-induced deaminase." *Nat Struct Mol Biol* **16**(5): 517-527.
- Payne, S. L. et J. H. Elder (2001). "The role of retroviral dUTPases in replication and virulence." *Curr Protein Pept Sci* **2**(4): 381-388.
- Payne, S. L., F. D. Fang, C. P. Liu, B. R. Dhruva, P. Rwambo, C. J. Issel et R. C. Montelaro (1987). "Antigenic variation and lentivirus persistence: variations in envelope gene sequences during EIAV infection resemble changes reported for sequential isolates of HIV." *Virology* **161**(2): 321-331.

- Pei, Y., D. C. Hodgins, C. Lee, J. G. Calvert, S. K. Welch, R. Jolie, M. Keith et D. Yoo (2008). "Functional mapping of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus capsid protein nuclear localization signal and its pathogenic association." Virus Res **135**(1): 107-114.
- Peloponese, J. M., Jr., Y. Collette, C. Gregoire, C. Bailly, D. Campese, E. F. Meurs, D. Olive et E. P. Loret (1999). "Full peptide synthesis, purification, and characterization of six Tat variants. Differences observed between HIV-1 isolates from Africa and other continents." J Biol Chem **274**(17): 11473-11478.
- Perkins, A., A. W. Cochrane, S. M. Ruben et C. A. Rosen (1989). "Structural and functional characterization of the human immunodeficiency virus rev protein." J Acquir Immune Defic Syndr **2**(3): 256-263.
- Pifat, D. Y., W. H. Ennis, J. M. Ward, M. S. Oberste et M. A. Gonda (1992). "Persistent infection of rabbits with bovine immunodeficiency-like virus." J Virol **66**(7): 4518-4524.
- Ping, Y. H. et T. M. Rana (1999). "Tat-associated kinase (P-TEFb): a component of transcription preinitiation and elongation complexes." J Biol Chem **274**(11): 7399-7404.
- Pollard, V. W. et M. H. Malim (1998). "The HIV-1 Rev protein." Annu Rev Microbiol **52**: 491-532.
- Pond, S. J., W. K. Ridgeway, R. Robertson, J. Wang et D. P. Millar (2009). "HIV-1 Rev protein assembles on viral RNA one molecule at a time." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(5): 1404-1408.
- Pringle, C. R. (1999). "Virus taxonomy--1999. The universal system of virus taxonomy, updated to include the new proposals ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses during 1998." Arch Virol **144**(2): 421-429.
- Puglisi, J. D., L. Chen, S. Blanchard et A. D. Frankel (1995). "Solution structure of a bovine immunodeficiency virus Tat-TAR peptide-RNA complex." Science **270**(5239): 1200-1203.
- Purvis, S. F., D. L. Georges, T. M. Williams et M. M. Lederman (1992). "Suppression of interleukin-2 and interleukin-2 receptor expression in Jurkat cells stably expressing the human immunodeficiency virus Tat protein." Cell Immunol **144**(1): 32-42.
- Quinones-Mateu, M. E., A. Holguin, J. Dopazo, I. Najera et E. Domingo (1996). "Point mutant frequencies in the pol gene of human immunodeficiency virus type 1 are two- to threefold lower than those of env." AIDS Res Hum Retroviruses **12**(12): 1117-1128.
- Rasband, W. S. (1997-2004a). ImageJ, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA <http://rsb.info.nih.gov/ij/>
- Rasband, W. S. (1997-2004b). "Rasband, W.S."

- Rasmussen, L., J. K. Battles, W. H. Ennis, K. Nagashima et M. A. Gonda (1990). "Characterization of virus-like particles produced by a recombinant baculovirus containing the gag gene of the bovine immunodeficiency-like virus." *Virology* **178**(2): 435-451.
- Rasmussen, L., J. D. Greenwood et M. A. Gonda (1992). "Expression of bovine immunodeficiency-like virus envelope glycoproteins by a recombinant baculovirus in insect cells." *Virology* **186**(2): 551-561.
- Rexach, M. et G. Blobel (1995). "Protein import into nuclei: association and dissociation reactions involving transport substrate, transport factors, and nucleoporins." *Cell* **83**(5): 683-692.
- Robbins, J., S. M. Dilworth, R. A. Laskey et C. Dingwall (1991). "Two interdependent basic domains in nucleoplasmin nuclear targeting sequence: identification of a class of bipartite nuclear targeting sequence." *Cell* **64**(3): 615-623.
- Roda, R. H., M. Balakrishnan, M. N. Hanson, B. M. Wohrl, S. F. Le Grice, B. P. Roques, R. J. Gorelick et R. A. Bambara (2003). "Role of the Reverse Transcriptase, Nucleocapsid Protein, and Template Structure in the Two-step Transfer Mechanism in Retroviral Recombination." *J Biol Chem* **278**(34): 31536-31546.
- Romanelli, M. G. et C. Morandi (2002). "Importin alpha binds to an unusual bipartite nuclear localization signal in the heterogeneous ribonucleoprotein type I." *Eur J Biochem* **269**(11): 2727-2734.
- Rovid, A. H., S. Carpenter et J. A. Roth (1995). "Monocyte function in cattle experimentally infected with bovine immunodeficiency-like virus." *Vet Immunol Immunopathol* **45**(1-2): 31-43.
- Ruben, S., A. Perkins, R. Purcell, K. Joung, R. Sia, R. Burghoff, W. A. Haseltine et C. A. Rosen (1989). "Structural and functional characterization of human immunodeficiency virus tat protein." *J Virol* **63**(1): 1-8.
- Ruhl, M., M. Himmelsbach, G. M. Bahr, F. Hammerschmid, H. Jaksche, B. Wolff, H. Aschauer, G. K. Farrington, H. Probst, D. Bevec et et al. (1993). "Eukaryotic initiation factor 5A is a cellular target of the human immunodeficiency virus type 1 Rev activation domain mediating trans-activation." *J Cell Biol* **123**(6 Pt 1): 1309-1320.
- Runyon, S. T. et J. D. Puglisi (2003). "Design of a cyclic peptide that targets a viral RNA." *J Am Chem Soc* **125**(51): 15704-15705.
- Saavedra, C., B. Felber et E. Izaurralde (1997). "The simian retrovirus-1 constitutive transport element, unlike the HIV-1 RRE, uses factors required for cellular mRNA export." *Curr Biol* **7**(9): 619-628.
- Sagou, K., M. Uema et Y. Kawaguchi (2010). "Nucleolin is required for efficient nuclear egress of herpes simplex virus type 1 nucleocapsids." *J Virol* **84**(4): 2110-2121.

- Said, E. A., J. Courty, J. Svab, J. Delbe, B. Krust et A. G. Hovanessian (2005). "Pleiotrophin inhibits HIV infection by binding the cell surface-expressed nucleolin." *FEBS J* **272**(18): 4646-4659.
- Salfeld, J., H. G. Gottlinger, R. A. Sia, R. E. Park, J. G. Sodroski et W. A. Haseltine (1990). "A tripartite HIV-1 tat-env-rev fusion protein." *Embo J* **9**(3): 965-970.
- Salsman, J., N. Zimmerman, T. Chen, M. Domagala et L. Frappier (2008). "Genome-wide screen of three herpesviruses for protein subcellular localization and alteration of PML nuclear bodies." *PLoS Pathog* **4**(7): e1000100.
- Saltarelli, M. J., E. Hadziyannis, C. E. Hart, J. V. Harrison, B. K. Felber, T. J. Spira et G. N. Pavlakis (1996). "Analysis of human immunodeficiency virus type 1 mRNA splicing patterns during disease progression in peripheral blood mononuclear cells from infected individuals." *AIDS Res Hum Retroviruses* **12**(15): 1443-1456.
- Schroder, A. R., P. Shinn, H. Chen, C. Berry, J. R. Ecker et F. Bushman (2002). "HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots." *Cell* **110**(4): 521-529.
- Schubert, U., L. C. Anton, I. Bacik, J. H. Cox, S. Bour, J. R. Bennink, M. Orlowski, K. Strebel et J. W. Yewdell (1998). "CD4 glycoprotein degradation induced by human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein requires the function of proteasomes and the ubiquitin-conjugating pathway." *J Virol* **72**(3): 2280-2288.
- Schwartz, O., V. Marechal, O. Danos et J. M. Heard (1995). "Human immunodeficiency virus type 1 Nef increases the efficiency of reverse transcription in the infected cell." *J Virol* **69**(7): 4053-4059.
- Seelamgari, A., A. Maddukuri, R. Berro, C. de la Fuente, K. Kehn, L. Deng, S. Dadgar, M. E. Bottazzi, E. Ghedin, A. Pumfery et F. Kashanchi (2004). "Role of viral regulatory and accessory proteins in HIV-1 replication." *Front Biosci* **9**: 2388-2413.
- Siomi, H., H. Shida, M. Maki et M. Hatanaka (1990). "Effects of a highly basic region of human immunodeficiency virus Tat protein on nucleolar localization." *J Virol* **64**(4): 1803-1807.
- Siomi, M. C., P. S. Eder, N. Kataoka, L. Wan, Q. Liu et G. Dreyfuss (1997). "Transportin-mediated nuclear import of heterogeneous nuclear RNP proteins." *J Cell Biol* **138**(6): 1181-1192.
- Sirri, V., S. Urcuqui-Inchima, P. Roussel et D. Hernandez-Verdun (2008). "Nucleolus: the fascinating nuclear body." *Histochem Cell Biol* **129**(1): 13-31.
- Smith, C. A., V. Calabro et A. D. Frankel (2000). "An RNA-binding chameleon." *Mol Cell* **6**(5): 1067-1076.
- Smith, H. E. et R. M. Jacobs (1993). "Serological evidence of bovine immunodeficiency-like virus infection in a sheep." *Can J Vet Res* **57**(4): 305-306.
- Snider, T. G., 3rd, D. G. Luther, B. F. Jenny, P. G. Hoyt, J. K. Battles, W. H. Ennis, J. Balady, U. Blas-Machado, T. X. Lemarchand et M. A. Gonda (1996).

- "Encephalitis, lymphoid tissue depletion and secondary diseases associated with bovine immunodeficiency virus in a dairy herd." Comp Immunol Microbiol Infect Dis **19**(2): 117-131.
- Snider, T. G., P. G. Hoyt, B. F. Jenny, K. S. Coats, D. G. Luther, R. W. Storts, J. K. Battles et M. A. Gonda (1997). "Natural and experimental bovine immunodeficiency virus infection in cattle." Vet Clin North Am Food Anim Pract **13**(1): 151-176.
- Somasekaram, A., A. Jarmuz, A. How, J. Scott et N. Navaratnam (1999). "Intracellular localization of human cytidine deaminase. Identification of a functional nuclear localization signal." J Biol Chem **274**(40): 28405-28412.
- St-Louis, M. C., Y. Abed et D. Archambault (2005). "The bovine immunodeficiency virus: cloning of a tat/rev cDNA encoding a novel Tat protein with enhanced transactivation activity." Arch Virol **150**(8): 1529-1547.
- St-Louis, M. C., M. Cojocariu et D. Archambault (2004). "The molecular biology of bovine immunodeficiency virus: a comparison with other lentiviruses." Anim Health Res Rev **5**(2): 125-143.
- Stade, K., C. S. Ford, C. Guthrie et K. Weis (1997). "Exportin 1 (Crm1p) is an essential nuclear export factor." Cell **90**(6): 1041-1050.
- Stark, L. A. et M. Taliany (2009). "Old and new faces of the nucleolus. Workshop on the Nucleolus and Disease." EMBO Rep **10**(1): 35-40.
- Stewart, M. (2007). "Molecular mechanism of the nuclear protein import cycle." Nat Rev Mol Cell Biol **8**(3): 195-208.
- Strebel, K., J. Luban et K. T. Jeang (2009). "Human cellular restriction factors that target HIV-1 replication." BMC Med **7**: 48.
- Stutz, F. et M. Rosbash (1994). "A functional interaction between Rev and yeast pre-mRNA is related to splicing complex formation." Embo J **13**(17): 4096-4104.
- Suarez, D. L., M. J. VanDerMaaten, C. Wood et C. A. Whetstone (1993). "Isolation and characterization of new wild-type isolates of bovine lentivirus." J Virol **67**(8): 5051-5055.
- Suarez, D. L. et C. A. Whetstone (1995). "Identification of hypervariable and conserved regions in the surface envelope gene in the bovine lentivirus." Virology **212**(2): 728-733.
- Suarez, D. L. et C. A. Whetstone (1997). "Size variation within the second hypervariable region of the surface envelope gene of the bovine lentivirus BIV in experimentally and naturally infected cattle." J Virol **71**(3): 2482-2486.
- Subbramanian, R. A., A. Kessous-Elbaz, R. Lodge, J. Forget, X. J. Yao, D. Bergeron et E. A. Cohen (1998). "Human immunodeficiency virus type 1 Vpr is a positive regulator of viral transcription and infectivity in primary human macrophages." J Exp Med **187**(7): 1103-1111.
- Suhasini, M. et T. R. Reddy (2009). "Cellular proteins and HIV-1 Rev function." Curr HIV Res **7**(1): 91-100.
- Taberner, C., A. S. Zolotukhin, J. Bear, R. Schneider, G. Karsenty et B. K. Felber (1997). "Identification of an RNA sequence within an intracisternal-A particle

- element able to replace Rev-mediated posttranscriptional regulation of human immunodeficiency virus type 1." *J Virol* **71**(1): 95-101.
- Talcott, B. et M. S. Moore (1999). "Getting across the nuclear pore complex." *Trends Cell Biol* **9**(8): 312-318.
- Tang, H., G. M. Gaietta, W. H. Fischer, M. H. Ellisman et F. Wong-Staal (1997). "A cellular cofactor for the constitutive transport element of type D retrovirus." *Science* **276**(5317): 1412-1415.
- Terry, L. J. et S. R. Wentz (2009). "Flexible gates: dynamic topologies and functions for FG nucleoporins in nucleocytoplasmic transport." *Eukaryot Cell* **8**(12): 1814-1827.
- Terzieva, V. (2008). "Regulatory T cells and HIV-1 infection." *Viral Immunol* **21**(3): 285-291.
- Threadgill, D. S., W. K. Steagall, M. T. Flaherty, F. J. Fuller, S. T. Perry, K. E. Rushlow, S. F. Le Grice et S. L. Payne (1993). "Characterization of equine infectious anemia virus dUTPase: growth properties of a dUTPase-deficient mutant." *J Virol* **67**(5): 2592-2600.
- Tijerina, P., S. Mohr et R. Russell (2007). "DMS footprinting of structured RNAs and RNA-protein complexes." *Nat Protoc* **2**(10): 2608-2623.
- Tiley, L. S. et B. R. Cullen (1992). "Structural and functional analysis of the visna virus Rev-response element." *J Virol* **66**(6): 3609-3615.
- Tobin, G. J., R. C. Sowder, 2nd, D. Fabris, M. Y. Hu, J. K. Battles, C. Fenselau, L. E. Henderson et M. A. Gonda (1994). "Amino acid sequence analysis of the proteolytic cleavage products of the bovine immunodeficiency virus Gag precursor polypeptide." *J Virol* **68**(11): 7620-7627.
- Truant, R. et B. R. Cullen (1999). "The arginine-rich domains present in human immunodeficiency virus type 1 Tat and Rev function as direct importin beta-dependent nuclear localization signals." *Mol Cell Biol* **19**(2): 1210-1217.
- Truyen, U., C. R. Parrish, T. C. Harder et O. R. Kaaden (1995). "There is nothing permanent except change. The emergence of new virus diseases." *Vet Microbiol* **43**(2-3): 103-122.
- Tsuji, T., N. Sheehy, V. W. Gautier, H. Hayakawa, H. Sawa et W. W. Hall (2007). "The nuclear import of the human T lymphotropic virus type I (HTLV-1) tax protein is carrier- and energy-independent." *J Biol Chem* **282**(18): 13875-13883.
- Tyagi, M., M. Rusnati, M. Presta et M. Giacca (2001). "Internalization of HIV-1 tat requires cell surface heparan sulfate proteoglycans." *J Biol Chem* **276**(5): 3254-3261.
- Van der Maaten, M. J., W. A. Malmquist et N. F. Cheville (1972). "Susceptibility of calves to bovine syncytial virus given by different inoculation routes." *Am J Vet Res* **33**(6): 1157-1160.
- Van Der Maaten, M. J. et C. A. Whetstone (1992). "Infection of rabbits with bovine immunodeficiency-like virus." *Vet Microbiol* **30**(2-3): 125-135.

- Vandegraaff, N. et A. Engelman (2007). "Molecular mechanisms of HIV integration and therapeutic intervention." *Expert Rev Mol Med* **9**(6): 1-19.
- VandeWoude, S. et C. Apetrei (2006). "Going wild: lessons from naturally occurring T-lymphotropic lentiviruses." *Clin Microbiol Rev* **19**(4): 728-762.
- Vazquez-Iglesias, L., I. Lostale-Seijo, J. Martinez-Costas et J. Benavente (2009). "Avian reovirus sigmaA localizes to the nucleolus and enters the nucleus by a nonclassical energy- and carrier-independent pathway." *J Virol* **83**(19): 10163-10175.
- Venables, C., R. Lysons, M. Horigan, D. Stagg et M. Dawson (1997). "Bovine immunodeficiency-like virus: inactivation in milk by pasteurisation." *Vet Rec* **140**(11): 275-277.
- Venkatesh, L. K. et G. Chinnadurai (1990). "Mutants in a conserved region near the carboxy-terminus of HIV-1 Rev identify functionally important residues and exhibit a dominant negative phenotype." *Virology* **178**(1): 327-330.
- von Schwedler, U., J. Song, C. Aiken et D. Trono (1993). "Vif is crucial for human immunodeficiency virus type 1 proviral DNA synthesis in infected cells." *J Virol* **67**(8): 4945-4955.
- Walde, S. et R. H. Kehlenbach (2010). "The Part and the Whole: functions of nucleoporins in nucleocytoplasmic transport." *Trends Cell Biol* **20**(8): 461-469.
- Walder, R., Z. Kalvatchev, G. J. Tobin, M. N. Barrios, D. J. Garzaro et M. A. Gonda (1995). "Possible role of bovine immunodeficiency virus in bovine paraplegic syndrome: evidence from immunochemical, virological and seroprevalence studies." *Res Virol* **146**(5): 313-323.
- Wareing, S., N. Hartaningsih, G. E. Wilcox et W. J. Penhale (1999). "Evidence for immunosuppression associated with Jembrana disease virus infection of cattle." *Vet Microbiol* **68**(1-2): 179-185.
- Weichselbraun, I., G. K. Farrington, J. R. Rusche, E. Bohnlein et J. Hauber (1992). "Definition of the human immunodeficiency virus type 1 Rev and human T-cell leukemia virus type I Rex protein activation domain by functional exchange." *J Virol* **66**(4): 2583-2587.
- Weis, K., I. W. Mattaj et A. I. Lamond (1995). "Identification of hSRP1 alpha as a functional receptor for nuclear localization sequences." *Science* **268**(5213): 1049-1053.
- Wen, W., J. L. Meinkoth, R. Y. Tsien et S. S. Taylor (1995). "Identification of a signal for rapid export of proteins from the nucleus." *Cell* **82**(3): 463-473.
- Wente, S. R. et M. P. Rout (2010). "The nuclear pore complex and nuclear transport." *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2**(10): a000562.
- Whetstone, C. A., K. R. Sayre, N. L. Dock, M. J. VanDerMaaten, J. M. Miller, E. Lillehoj et S. S. Alexander (1992). "Examination of whether persistently indeterminate human immunodeficiency virus type 1 Western immunoblot reactions are due to serological reactivity with bovine immunodeficiency-like virus." *J Clin Microbiol* **30**(4): 764-770.

- Whetstone, C. A., D. L. Suarez, J. M. Miller, B. A. Pesch et J. A. Harp (1997). "Bovine lentivirus induces early transient B-cell proliferation in experimentally inoculated cattle and appears to be pantropic." *J Virol* **71**(1): 640-644.
- Whetstone, C. A., M. J. VanDerMaaten et J. W. Black (1990). "Humoral immune response to the bovine immunodeficiency-like virus in experimentally and naturally infected cattle." *J Virol* **64**(7): 3557-3561.
- Whetstone, C. A., M. J. VanDerMaaten et J. M. Miller (1991). "A western blot assay for the detection of antibodies to bovine immunodeficiency-like virus in experimentally inoculated cattle, sheep, and goats." *Arch Virol* **116**(1-4): 119-131.
- Wilcox, G. E., B. J. Chadwick et G. Kertayadnya (1995). "Recent advances in the understanding of Jembrana disease." *Vet Microbiol* **46**(1-3): 249-255.
- Wildum, S., M. Schindler, J. Munch et F. Kirchhoff (2006). "Contribution of Vpu, Env, and Nef to CD4 down-modulation and resistance of human immunodeficiency virus type 1-infected T cells to superinfection." *J Virol* **80**(16): 8047-8059.
- Wodrich, H., A. Cassany, M. A. D'Angelo, T. Guan, G. Nemerow et L. Gerace (2006). "Adenovirus core protein pVII is translocated into the nucleus by multiple import receptor pathways." *J Virol* **80**(19): 9608-9618.
- Wright, S. M., A. Mleczko et K. S. Coats (2002). "Bovine immunodeficiency virus expression in vitro is reduced in the presence of beta-chemokines, MIP-1alpha, MIP-1beta and RANTES." *Vet Res Commun* **26**(3): 239-250.
- Wu, Y. (2008). "The second chance story of HIV-1 DNA: Unintegrated? Not a problem!" *Retrovirology* **5**: 61.
- Xu, D., A. Farmer et Y. M. Chook (2010). "Recognition of nuclear targeting signals by Karyopherin-beta proteins." *Curr Opin Struct Biol* **20**(6): 782-790.
- Xuan, C., W. Qiao, J. Li, G. Peng, M. Liu, Q. Chen, J. Zhou et Y. Geng (2008). "BTat, a trans-acting regulatory protein, contributes to bovine immunodeficiency virus-induced apoptosis." *Cell Microbiol* **10**(1): 31-40.
- Yang, J., H. P. Bogerd, S. Peng, H. Wiegand, R. Truant et B. R. Cullen (1999). "An ancient family of human endogenous retroviruses encodes a functional homolog of the HIV-1 Rev protein." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(23): 13404-13408.
- Ye, X., R. A. Kumar et D. J. Patel (1995). "Molecular recognition in the bovine immunodeficiency virus Tat peptide-TAR RNA complex." *Chem Biol* **2**(12): 827-840.
- Yeung, P. L., A. Zhang et J. D. Chen (2006). "Nuclear localization of coactivator RAC3 is mediated by a bipartite NLS and importin alpha3." *Biochem Biophys Res Commun* **348**(1): 13-24.
- Young, T. M., Q. Wang, T. Pe'ery et M. B. Mathews (2003). "The human I-mfa domain-containing protein, HIC, interacts with cyclin T1 and modulates P-TEFb-dependent transcription." *Mol Cell Biol* **23**(18): 6373-6384.

- Younis, I. et P. L. Green (2005). "The human T-cell leukemia virus Rex protein." Front Biosci **10**: 431-445.
- Zanelli, C. F. et S. R. Valentini (2007). "Is there a role for eIF5A in translation?" Amino Acids **33**(2): 351-358.
- Zapp, M. L. et M. R. Green (1989). "Sequence-specific RNA binding by the HIV-1 Rev protein." Nature **342**(6250): 714-716.
- Zapp, M. L., T. J. Hope, T. G. Parslow et M. R. Green (1991). "Oligomerization and RNA binding domains of the type 1 human immunodeficiency virus Rev protein: a dual function for an arginine-rich binding motif." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(17): 7734-7738.
- Zemmel, R. W., A. C. Kelley, J. Karn et P. J. Butler (1996). "Flexible regions of RNA structure facilitate co-operative Rev assembly on the Rev-response element." J Mol Biol **258**(5): 763-777.
- Zhang, H., Y. Zhang, T. P. Spicer, L. Z. Abbott, M. Abbott et B. J. Poiesz (1993). "Reverse transcription takes place within extracellular HIV-1 virions: potential biological significance." AIDS Res Hum Retroviruses **9**(12): 1287-1296.
- Zhang, J., N. Tamilarasu, S. Hwang, M. E. Garber, I. Huq, K. A. Jones et T. M. Rana (2000). "HIV-1 TAR RNA enhances the interaction between Tat and cyclin T1." J Biol Chem **275**(44): 34314-34319.
- Zhang, M. J. et A. I. Dayton (1998). "Tolerance of diverse amino acid substitutions at conserved positions in the nuclear export signal (NES) of HIV-1 Rev." Biochem Biophys Res Commun **243**(1): 113-116.
- Zhang, S., D. L. Troyer, S. Kapil, L. Zheng, G. Kennedy, M. Weiss, W. Xue, C. Wood et H. C. Minocha (1997a). "Detection of proviral DNA of bovine immunodeficiency virus in bovine tissues by polymerase chain reaction (PCR) and PCR in situ hybridization." Virology **236**(2): 249-257.
- Zhang, S., C. Wood, W. Xue, S. M. Krukenberg, Q. Chen et H. C. Minocha (1997b). "Immune suppression in calves with bovine immunodeficiency virus." Clin Diagn Lab Immunol **4**(2): 232-235.
- Zolotukhin, A. S., A. Valentin, G. N. Pavlakis et B. K. Felber (1994). "Continuous propagation of RRE(-) and Rev(-)RRE(-) human immunodeficiency virus type 1 molecular clones containing a cis-acting element of simian retrovirus type 1 in human peripheral blood lymphocytes." J Virol **68**(12): 7944-7952.
- Zou, L., M. C. Barr, W. A. Hoose et R. J. Avery (1997). "Characterization of the transcription map and Rev activity of a highly cytopathic feline immunodeficiency virus." Virology **236**(2): 266-278.